

**Quantitative NMR-Spektroskopie als Referenzverfahren  
in der analytischen Chemie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Frank Malz

geboren am 09.11.1969 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. M. Linscheid

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Zschunke
2. Prof. Dr. M. Linscheid
3. Prof. Dr. P. Reich

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2003

## Abkürzungsverzeichnis

### Symbole

$\alpha$	Anregungswinkel (Flipwinkel)
$\eta$	Kern-Overhauser-Verstärkungsfaktor
$\rho$	Verhältnis zwischen der effektiven und der gesamten Induktivität
$\xi$	Füllfaktor der Empfänger-Spule ( $\xi < 1$ )
$\gamma$	Gyromagnetisches Verhältnis
$\mu_0$	Permeabilität des freien Raumes
$\tau$	Zeitsequenz
$\nu_{1/2}$	Breite des Signals auf halber Höhe (Halbwertsbreite)
$\omega_0$	Larmor-Frequenz
$\omega$	Frequenz
$B_0$	Statistisches, äußeres Magnetfeld
$B_{rd}$	Radiation Damping Magnetfeld (radiation damping field)
$c_i$	Empfindlichkeitskoeffizient
$f$	Füllfaktor
$f_i$	Freiheitsgrad
$f_{eff}$	effektiver Freiheitsgrad
$f_{Std}$	Reinheitsfaktor des Standards
$F$	Rauschgröße (noise figure) des Vorverstärkers
$G$	Gesamtverstärkung (overall gain) des Empfängers
$\hbar$	Plancksches Wirkungsquantum dividiert durch $2\pi$
$\hat{I}$	Kernspin
$I_x$	Integrale Intensität des Signals der beteiligten Kerne der Sorte $x$
$k$	Erweiterungsfaktor
$k_B$	Boltzmann-Konstante
$k_S$	Spektrometerkonstante
$m_i$	Masse der Komponente $i$
$M_i$	Molmasse der Komponente $i$
$N_x$	Anzahl der Kerne $x$
$n_i$	Molzahl der Komponente $i$
$ns$	Anzahl der Akkumulationen
$p$	Grad des Vertrauens (Konfidenzniveau, Konfidenzintervall)
$P$	Reinheitsgrad in g/g %
$Q$	Qualitätsfaktor der Spule
$r$	Atomabstand

$s(x)$	Standardabweichung
$S(\omega)$	Signal bei der Frequenz $\omega$ (Real- und Imaginärteil)
$T$	Temperatur
$T_1$	Longitudinale (Spin-Gitter-) Relaxationszeit
$T_2^*$	Zusammengesetzte transversale Relaxationszeit
$T_{rd}$	Auf Radiation Damping beruhende Relaxationszeit
$u(x)$	Standardunsicherheit
$u_c(y)$	Kombinierte Standardunsicherheit
$U$	Erweiterte Messunsicherheit
$V_c$	Volumen, das durch die Empfängerspule umschlossen wird
$\bar{x}$	Schätzwert (arithmetischer Mittelwert)
$x_{Ref}$	(gravimetrischer) Referenzwert
$x_1, x_2, \dots, x_n$	Eingangsgrößen
$\Delta \bar{x}$	Abweichung des Mittelwertes vom Referenzwert
$y(x_1, x_2, \dots, x_n)$	Messgröße

### Abkürzungen

ADC	Analog-Digital-Wandler (Analog-Digital-Converter)
aliph (Index)	aliphatisch
Anl (Index)	Analyt
arom (Index)	aromatisch
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
BB	Breitband
BIPM	Internationales Büro für Maß und Gewicht (Bureau International des Poids et Mesures)
CIPM	Komitee für Maß und Gewicht (Comité international des Poids et Mesures)
CIPM-MRA	Mutual Recognition Arrangement of National Measurement Standards and of Calibration Certificates issued by National Metrology Institutes
CITAC	Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry
CCQM	Beratendes Komitee für chemische Messungen (Comité Consultatif pour la Quantité de Matière)
Cy <sub>12</sub>	Cyclododekan
D <sub>4</sub>	Oktamethylcyclotetrasiloxan
DKD	Deutscher Kalibrierdienst
DMSO-d <sub>6</sub>	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
Dur	Durol (1,2,4,5-Tetramethylbenzol)

## Abkürzungsverzeichnis

---

em	exponentielle Multiplikation
ERETIC	Electronic-REference To access In vivo Concentrations
ETB	Ethylbenzol
ETS	Ethyl-4-toluolsulfonat
FID	Freier Induktionsabfall (Free Induction Decay)
FT	Fourier-Transformation
GC	Gas-Chromatographie (Gas-Chromatography)
GUM	Leitfaden zur Angabe der Messunsicherheit (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)
Hrsg.	Herausgeber
HPLC	Hochleistungs-/Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High-Performance/Pressure-Chromatography)
HUB	Humboldt Universität zu Berlin
ISO	Internationale Normierungsorganisation (International Organization for Standards)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
lb	Line broadening
MAS	Rotation im magischen Winkel (Magic Angle Spinning)
MP	Multi-Pulse
NMR	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear-Overhauser-Effect)
Par	[2,2]-Paracyclophan
PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
RG	Receiver Gain
RM	Referenzmaterial
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SI	Internationales Einheitensystem (Système International d' Unités)
SP	Single-Pulse
SRM	Standard-Referenzmaterial (Standard Reference Material)
Std (Index)	Standard
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Signal-to-Noise-Ratio)
TBT-Cl	Tributylzinnchlorid
TD	Anzahl der Datenpunkte
TSP	3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz
$W_0$	Nullquantenübergang (Wahrscheinlichkeit)
$W_2$	Doppelquantenübergang (Wahrscheinlichkeit)
ZA-Sinzig	Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH in Sinzig
ZRM	Zertifiziertes Referenzmaterial

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Ziele und Schwerpunkte .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Grundlagen der quantitativen NMR-Spektroskopie .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Primäre Methode.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2</b>	<b>Single-Pulse-Experimente .....</b>	<b>6</b>
3.2.1	Aufnahme-Parameter .....	7
3.2.2	Prozessierungs-Parameter .....	8
3.2.3	Spektrenkorrekturen und Integration .....	9
<b>3.3</b>	<b>Multi-Pulse-Experimente .....</b>	<b>9</b>
3.3.1	Lösungsmittelunterdrückung (Solvent Suppression) .....	9
3.3.1.1	Presaturation .....	10
3.3.1.2	Watergate.....	10
3.3.1.3	LC1WET .....	11
3.3.2	$^1\text{H}$ -Breitband-Entkopplung in der $^{13}\text{C}$ -NMR.....	12
<b>3.4</b>	<b>Kern-Overhauser-Effekt.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5</b>	<b>Bestimmung von Relativgrößen .....</b>	<b>14</b>
<b>3.6</b>	<b>Bestimmung von Absolutgrößen .....</b>	<b>14</b>
3.6.1	Standards.....	15
3.6.2	Reinheitsbestimmung.....	15
3.6.3	Gehaltsanalyse .....	16
<b>4</b>	<b>Unsicherheitsbetrachtung .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeines Verfahren zur Berechnung der Messunsicherheit .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Unsicherheitsbudget für die quantitative NMR-Spektroskopie .....</b>	<b>19</b>
4.2.1	Intensitätsverhältnis (Integration) .....	20
4.2.2	Anzahl der zur Resonanzlinie beitragenden Kerne $N$ .....	20
4.2.3	Molmasse .....	20
4.2.4	Einwaage.....	21
4.2.5	Reinheitsgrad, Reinheitsfaktor .....	22

---

<b>4.3</b>	<b>Ermittlung der Messunsicherheit von quantitativen NMR-Analyseverfahren mittels Referenzwerten.....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Stoffmengenverhältnisse und -anteile .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Grundvoraussetzungen zur Bestimmung der Genauigkeit der Methode.....</b>	<b>25</b>
5.1.1	Anforderungen an eine ideale Modell-Lösung.....	25
5.1.2	Arbeitsanweisung zur Aufnahme und Auswertung quantitativer Single-Pulse-NMR-Spektren .....	26
<b>5.2</b>	<b>Nationaler und internationaler Ringversuch (NMR-2, CCQM-P3).....</b>	<b>27</b>
5.2.1	Probenzusammensetzung .....	27
5.2.2	Vorschriften zur Messung und Auswertung.....	31
5.2.3	Auswertung des internationalen Ringversuchs CCQM-P3 .....	32
5.2.4	Auswertung des nationalen Ringversuchs NMR-2 .....	35
5.2.5	Zusammenfassung.....	40
<b>5.3</b>	<b>Ermittlung von Einflussgrößen .....</b>	<b>40</b>
5.3.1	Auswertung der Spektren.....	40
5.3.2	Integration des ETS (o-Isomer).....	41
5.3.3	Spektren- und Filterweite .....	43
5.3.4	Operator-Einfluss .....	45
5.3.5	Auswertungsmethoden und -programme .....	48
5.3.6	Messköpfe .....	50
5.3.7	Radiation Damping .....	51
5.3.8	Zusammenfassung.....	52
<b>5.4</b>	<b>Modell-Mixturen mit überlagerten Signalen .....</b>	<b>53</b>
5.4.1	Benzoessäure - Ethylbenzoat .....	53
5.4.2	Ethylbenzoat - Phthalsäurediethylester .....	55
5.4.3	Xylol-Isomere .....	57
5.4.3.1	Einfluss des Lösungsmittels .....	58
5.4.3.2	Einsatz von Verschiebungsreagenzien .....	58
5.4.3.3	Größere Magnetfeldstärke .....	60
<b>5.5</b>	<b>Unsicherheitsbudget .....</b>	<b>60</b>
<b>5.6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Reinheitsbestimmung .....</b>	<b>64</b>
<b>6.1</b>	<b>Reinheitsbestimmung mit der <math>^1\text{H}</math>-NMR .....</b>	<b>64</b>

---

6.1.1	Maleinsäure .....	64
6.1.1.1	Probenpräparation und Spektrenaufnahme .....	64
6.1.1.2	Auswertung .....	65
6.1.1.3	Unsicherheitsbudget .....	67
6.1.1.4	Messunsicherheit des Analysenverfahrens .....	68
6.1.2	Referenzmaterialien im pharmazeutischen Bereich .....	69
6.1.2.1	Analysenverfahren des ZA-Sinzig .....	69
6.1.2.2	Erarbeitung eines Analysenverfahrens .....	70
6.1.2.2.1	Probenpräparation und Spektrenaufnahme .....	70
6.1.2.2.2	Auswertung: Spiraeosid .....	70
6.1.2.2.3	Auswertung: Thymol .....	71
6.1.2.2.4	Auswertung: Loganin .....	72
6.1.2.3	Unsicherheitsbudget .....	74
6.1.3	Diskussion und Zusammenfassung .....	75
<b>6.2</b>	<b>Reinheitsbestimmung mit der <math>^{13}\text{C}</math>-NMR .....</b>	<b>76</b>
6.2.1	Xylol (Vorbereitung CCQM-P20b) .....	76
6.2.1.1	Probenpräparation und Spektrenaufnahme .....	76
6.2.1.2	Auswertung .....	77
6.2.1.3	Messunsicherheit des Analysenverfahrens .....	79
6.2.2	Internationaler Ringversuch CCQM-P20a .....	79
6.2.2.1	Probenpräparation und Spektrenaufnahme .....	80
6.2.2.2	Auswertung .....	80
6.2.2.3	Unsicherheitsbudget .....	83
6.2.2.4	Ergebnisse des Ringversuches CCQM-P20a .....	84
6.2.2.5	Messung am 800 MHz-Spektrometer .....	84
6.2.3	Diskussion und Zusammenfassung .....	85
<b>6.3</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Gehaltsanalyse .....</b>	<b>88</b>
<b>7.1</b>	<b>3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz in <math>\text{D}_2\text{O}</math> .....</b>	<b>88</b>
7.1.1	Probenpräparation und Spektrenaufnahme .....	88
7.1.2	Auswertung .....	89
7.1.3	Unsicherheitsbudget .....	90
7.1.4	Messunsicherheit des Verfahrens .....	91
<b>7.2</b>	<b>Ethanol in Wasser (forensische Chemie) .....</b>	<b>92</b>
7.2.1	Direkte Auswertung ohne Standard .....	92
7.2.2	Auswahl an internen Standards .....	93

---

7.2.3	Single-Puls-Experiment .....	94
7.2.4	Wasser-Unterdrückungsmethoden (Multi-Puls-Experimente) .....	94
7.2.4.1	Presaturation .....	94
7.2.4.1.1	Optimierung des Sättigungspulses .....	95
7.2.4.2	Watergate .....	98
7.2.4.2.1	Einfluss des optimalen Gradientenverhältnisses .....	99
7.2.4.2.2	Modifizierte Watergate-Sequenzen .....	99
7.2.4.3	LC1WET .....	100
7.2.5	Vergleich der Wasserunterdrückungsmethoden .....	101
7.2.5.1	Erreichte Dämpfung des H <sub>2</sub> O-Signals .....	101
7.2.5.2	Spektrenform .....	102
7.2.5.3	Anregungsprofil der Unterdrückungsmethoden .....	103
7.2.5.4	Richtigkeit der Messergebnisse .....	104
7.2.5.5	Diskussion und Zusammenfassung .....	105
7.2.6	Erarbeitung eines Analysenverfahrens .....	106
7.2.6.1	Probenpräparation .....	106
7.2.6.2	Spektrenaufnahme und -prozessierung .....	106
7.2.6.3	Auswertung .....	106
7.2.7	Unsicherheitsbudget .....	107
<b>7.3</b>	<b>Internationaler Ringversuch CCQM-P35 .....</b>	<b>107</b>
7.3.1	Messvorschrift .....	107
7.3.2	Auswertung .....	108
7.3.2.1	Forensische Probe .....	108
7.3.2.2	Weinanalyse .....	111
7.3.3	Nationaler Ringversuch NMR-3 .....	113
7.3.4	Messunsicherheit des Analysenverfahrens .....	114
<b>7.4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Die quantitative NMR als Referenzverfahren .....</b>	<b>117</b>
<b>8.1</b>	<b>Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen in Mehrkomponentengemischen mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie .....</b>	<b>119</b>
<b>8.2</b>	<b>Reinheitsbestimmung von organischen Verbindungen mittels <sup>1</sup>H- oder <sup>13</sup>C- NMR-Spektroskopie .....</b>	<b>120</b>
<b>8.3</b>	<b>Gehaltsbestimmung von organischen Verbindungen mittels <sup>1</sup>H-NMR- Spektroskopie .....</b>	<b>121</b>
<b>8.4</b>	<b>Gehaltsbestimmung in wässriger Matrix mit der NMR-Spektroskopie unter</b>	



---

	<b>Einsatz der Wasserunterdrückungstechnik (hier: Ethanol).....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>136</b>
<b>11.1</b>	<b>Tabellen .....</b>	<b>136</b>
<b>11.2</b>	<b>Geräte und Chemikalien .....</b>	<b>141</b>
<b>11.3</b>	<b>Presaturation-Pulsprogramme .....</b>	<b>143</b>

## 1 Einleitung

Im Zeitalter der immer weitergreifenden Globalisierung von Handel und Wirtschaft ist die gegenseitige Anerkennung von Analysenergebnissen von steigender Bedeutung [1]. Mit dem Inkrafttreten des „Mutual Recognition Arrangement of National Measurement Standards and of Calibration Certificates issued by National Metrology Institutes (CIPM-MRA)“ des Internationalen Komitees für Maß und Gewicht (Comité International des Poids et Mesures, CIPM) 1999 wurde dazu ein wichtiger Beitrag geleistet. Um die Nationalen Rückführungssysteme miteinander zu vergleichen und den Grad der Übereinstimmung zu bestimmen, werden hierzu in den einzelnen Fachgruppen des CIPM (für das Mol das Beratende Komitee für chemische Messungen (Comité Consultatif pour la Quantité de Matière, CCQM)) ausgewählte „Key Comparisons“ (Schlüsselvergleiche) durchgeführt [2]. Die nationalen Rückführungsaufgaben in Deutschland werden von der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) und der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) übernommen. Für die SI-Einheit die Stoffmenge – das Mol – hat die BAM in Zusammenarbeit mit der PTB die Zuständigkeit für nationale Normale erhalten. Für die Rückführungsaufgaben werden, wenn möglich, direkte Primärmethoden eingesetzt, da nur diese die direkte Verbindung zu den SI-Einheiten herstellen. Andernfalls werden zertifizierte Referenzmaterialien (ZRM) verwendet, die die Rückführung auf die SI-Einheiten und somit die Richtigkeit der Messgröße [3, 4, 5] gewährleisten. Alternativ stellen Parallelmessungen mit Referenzverfahren ebenfalls die Rückführung sicher [6]. Diese bieten gegenüber den Referenzmaterialien den Vorteil, dass Kalibrierungen an realen oder realitätsnahen Proben durchgeführt werden [7].

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist eine der wichtigsten und am weit verbreitetsten Methoden der Spektroskopie. Ihre ausgezeichneten selektiven Eigenschaften in der Strukturanalytik haben sie in fast jedem chemisch forschenden Labor unabkömmlich gemacht [8]. Darüber hinaus finden die hochauflösenden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR immer mehr Anwendung in der quantitativen Analytik. Es sollen daher in der vorliegenden Arbeit die folgenden vier, für die quantitative NMR einfachsten Anwendungsgebiete betrachtet werden: Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen in  $\text{mol mol}^{-1}$ , Bestimmung von Stoffmengenanteilen in  $\text{mol/mol } \%$ , Reinheitsanalyse in  $\text{g/g } \%$  und Gehaltsanalyse in  $\text{mg g}^{-1}$ . Dass die quantitative hochauflösende NMR-Spektroskopie das Potenzial zu einer relativen primären Methode hat, steht außer Frage [6, 9, 10]. Jedoch ist für die vier oben genannten Anwendungsgebiete bis heute die Messunsicherheit der NMR-Spektroskopie noch nicht mit einem vollständigen Unsicherheitsbudget belegt worden, so wie es vom Leitfaden der ISO (kurz GUM genannt) gefordert wird [11]. Es sollen daher, um für alle NMR-Spektrometer eine gültige Aussage über die erreichbare Messunsicherheit zu treffen, allgemeingültige Standardarbeitsanweisungen sowie nach GUM die vollständigen Unsicherheitsbudgets erarbeitet werden. Zudem sollen erstmals die Randbedingungen für den Einsatz der quantitativen NMR-Spektroskopie als Referenzverfahren untersucht und definiert werden.

## 2 Ziele und Schwerpunkte

Die vorliegende Arbeit wurde an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in der Abteilung I „Analytische Chemie; Referenzmaterialien“ im Labor I.31 „Magnetische Resonanzspektroskopie“ (Projekt 0103-I-0029) durchgeführt. Das Thema dieser Arbeit entspricht dem Kompetenzbereich der Abteilung „Entwicklung, Bereitstellung und Bewertung zuverlässiger Referenzmaterialien und -verfahren in der Analytischen Chemie“. Die BAM hat als ein Nationales Metrologieinstitut Deutschlands die Aufgabe, durch Beteiligung an internationalen Studien und „Key-Comparisons“ die internationale Vergleichbarkeit der nationalen Rückführungssysteme für die SI-Einheit in der Chemie (hier: das Mol) mit geeigneten Methoden oder Verfahren zu gewährleisten.

Die Arbeit verfolgt die beiden Ziele, die hochauflösende Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie als eine relative primäre Methode zu etablieren, und darauf aufbauend, sie als Referenzverfahren zur Validierung anderer Methoden und zur Zertifizierung von Referenzmaterialien einzusetzen. Dafür werden zur optimalen Bearbeitung Stoffsysteme mit einfachen, linienarmen Spektren untersucht, die sich an den aktuellen Aufgaben des CCQM orientieren.

Entsprechend der für das CCQM formulierten Definition einer primären Methode [12] bilden

1. das Aufstellen von Messgleichungen,
2. das Beschreiben der Methode/Verfahren mit allen physikalischen Parametern entsprechend der Messgleichungen,
3. das Aufstellen von Unsicherheitsbudgets und
4. die Bestimmung der metrologischen Qualität

für vier zu betrachtende Anwendungen der quantitativen NMR (Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen sowie Reinheits- und Gehaltsanalyse) die Schwerpunkte dieser Arbeit. Der Begriff metrologische Qualität gibt die geringste erreichbare Messunsicherheit, einem dem Messergebnis zugeordneten Parameter, der die Streuung der Werte kennzeichnet, die vernünftigerweise der Messgröße zugeordnet werden könnte (Definition nach dem internationalen Wörterverzeichnis der Metrologie (VIM [13])).

Zur Bearbeitung der ersten beiden Schwerpunkte werden, bei der Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen mit der  $^1\text{H}$ -Single-Pulse-NMR beginnend, die Messgleichungen aufgestellt und – aufbauend auf der eigenen Diplomarbeit [14] – systematisch alle physikalischen Parameter und Einflussgrößen entsprechend der Messgleichung in weiten Bereichen variiert und ihre Auswirkungen sowie der Einfluss des Operators auf die Messunsicherheit quantifiziert. Diese Erkenntnisse werden für die Validierung der Verfahren zur Reinheits- und Gehaltsbestimmung übernommen und entsprechend der Messgleichung erweitert. Für die Absicherung der Analysenergebnisse sind qualitätssichernde Maßnahmen erforderlich. Es wird damit begonnen, ein System von NMR Referenzmaterialien (Standards) zu entwickeln, die der Forderung nach metrologischer Rückführung genügen. Um Spezial-

effekte zu identifizieren und ihren Einfluss auf Messergebnisse zu quantifizieren (Filterfunktionen, Radiation Damping) sind Messungen an der Humboldt-Universität zu Berlin (HUB) und bei der Firma Bruker BioSpin GmbH nötig. Des Weiteren wird der quantitative Einsatz modernster NMR-Technik (18,8 T Höchstfeldgerät und Kryo-Messkopf) getestet und bewertet. Für die Reinheitsbestimmung von Xylofen und Tributylzinchlorid soll die  $^1\text{H}$ -entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR validiert und für die Gehaltsbestimmung von Ethanolösungen im forensischen Bereich (ca. 0,1 % Ethanol in Wasser) das Prinzip der  $^1\text{H}$ -Wasserunterdrückung für quantitative NMR erstmalig entwickelt werden. Alle diese Untersuchungen sind wissenschaftliches Neuland für die quantitative NMR-Spektroskopie.

Daran anschließend sollen erstmals für alle Anwendungen der quantitativen hochauflösenden Flüssigkeits-NMR entsprechend den Messgleichungen die vollständigen Unsicherheitsbudgets aufgestellt werden. Diese werden nach dem allgemeingültigen und weltweit anerkannten Leitfaden zur Ermittlung von Messunsicherheiten erarbeitet, der von der „International Organization for Standards (ISO)“ veröffentlicht wurde.

Mittels ausgearbeiteter und stufenweise verbesserten Arbeitsanweisungen werden nationale (Teilnehmer: Industrie, Hochschulen, Forschungsinstitute) und internationale Ringversuche (Teilnehmer: Nationale Metrologieinstitute) durchgeführt, um kompetente Aussagen für die Güte der in dieser Arbeit behandelten Verfahren (Stoffmengenverhältnisse und –anteile, Reinheitsbestimmung und Gehaltsbestimmung) zu treffen. Auf höchstem metrologischen Niveau wird durch die Beteiligung an internationalen CCQM-Ringversuchen die Messunsicherheit der quantitativen NMR-Spektroskopie mit denen anderer analytischer Verfahren verglichen und bewertet.

Im Verlauf dieser Arbeit werden alle auftretenden Probleme untersucht und zu deren Lösung Arbeitsanweisungen für die praktische Laborarbeit erarbeitet. Damit soll, dem Multiplikator-Prinzip entsprechend, Prinzip und Prozedur metrologischer Rückführung an nationale und internationale NMR-Forschungsinstitutionen weitergegeben werden.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Verallgemeinerung der in der vorliegenden Arbeit erarbeiteten Verfahren mit der quantitativen NMR-Spektroskopie, um sie als Referenzverfahren zu etablieren. Dazu werden die gewonnenen Ergebnisse kritisch diskutiert und bewertet, um allgemeine Schlussfolgerungen zur Anwendbarkeit auch für komplexere Einsatzgebiete (Pharmazie, Biochemie, etc.) zu ziehen. Hierzu sind die Randbedingungen für die Prüfbereiche, die Ergebnisunsicherheiten in diesen Prüfbereichen und die genauen Einsatzgebiete zu diskutieren und festzulegen.

### 3 Grundlagen der quantitativen NMR-Spektroskopie

Es sollen hier nur die Grundlagen beschrieben werden, die in dieser Arbeit für die quantitative hochauflösende Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie von Bedeutung sind. Die allgemeinen Grundlagen der NMR-Spektroskopie sind in Lehrbüchern von z.B. Derome [15], Günther [16], Friebolin [17] und Levitt [18] nachzulesen.

Die wichtigste Grundlage der quantitativen NMR-Spektroskopie ist die direkte Proportionalität von Intensität eines Signals  $I_x$  im Spektrum und der zur Resonanzlinie beitragenden Kernanzahl  $N_x$

$$I_x = k_s \cdot N_x, \quad (3.1)$$

wobei  $k_s$  hier als Spektrometerkonstante bezeichnet wird. Die Herleitung dieser Beziehung beruht auf der Beschreibung eines als Lorentzlinie dargestellten Signals  $S(\omega)$  bei einer Frequenz  $\omega$  im Frequenzspektrum durch folgende Gleichungen [19]:

$$S(\omega) = \frac{1}{4} G K T_2^* (1 + i \Delta \omega T_2^*) / \left( 1 + \frac{1}{4} \Delta \omega^2 T_2^{*2} \right) \quad (3.2)$$

mit

$$K = \frac{n \rho \xi Q \omega_0 V_c \sin \alpha}{a} \cdot \frac{N B_0 \gamma^2 \hbar^2 \hat{I}(\hat{I} + 1)}{3 k_B T}, \quad (3.3)$$

wobei  $\hat{I}$  für den Kernspin steht. Der in der 1D-NMR auszuwertende Realteil des Spektrums enthält das Absorptionssignal, das, aus Gleichung (3.2) hergeleitet, beschrieben wird durch:

$$A(\omega) = \frac{1}{4} G K T_2^* \frac{1}{1 + \frac{1}{4} \Delta \omega^2 T_2^{*2}}. \quad (3.4)$$

Die Integration dieser Gleichung von  $-\infty$  bis  $+\infty$  (Lorentzlinie) nach  $\Delta \omega$  gibt die Intensität des Signals wieder, die bei Heranziehen der Gleichung (3.3) proportional zu  $N$  ist:

$$I(\omega) = \frac{\pi}{2} G K = \frac{\pi \gamma^3 \hbar^2 \hat{I}(\hat{I} + 1)}{6 k_B T} \cdot \frac{n \rho \xi Q V_c}{a} \cdot B_0^2 G N \sin \alpha = k_s \cdot N. \quad (3.5)$$

Für die in dieser Arbeit betrachtete  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Single-Pulse-NMR-Spektroskopie ist  $k_s$  bei Einhaltung der optimalen Aufnahmeparameter innerhalb eines Spektrums konstant. Beim Bezug zweier Signale in einem Spektrum zueinander kürzt sich damit  $k_s$  heraus.

Theoretisch ist es möglich, die Signalintensität aus den Naturkonstanten und den Parametern der Probe und des Empfängers von der folgenden Formel ausgehend herzuleiten [19]:

$$R(\omega) = \underbrace{\left[ \frac{\gamma \hbar^2 \hat{I}(\hat{I} + 1)}{24 k_B^{3/2} \mu_0^{1/2}} \right]}_{\text{Fundamental- konstanten}} \underbrace{\left[ \frac{N \omega^{3/2} (T_2^*)^{1/2}}{T^{3/2}} \right]}_{\text{Parameter der Probe}} \underbrace{\left[ \frac{2 \xi^2 \rho Q V_c}{\lambda F} \right]^{1/2}}_{\text{Parameter des Empfängers}} \sin \alpha, \quad (3.6)$$

wobei  $R(\omega)$  das Verhältnis zwischen Signalamplitude und Rauschen wiedergibt. Während die Parameter der ersten beiden Terme grundsätzlich bekannt oder bestimmbar sind, ist dies bei den folgenden Parametern des dritten Terms nicht der Fall: der Qualitätsfaktor der Spule  $Q$ , das Verhältnis zwischen der effektiven und der gesamten Induktivität  $\rho$ , der Füllfaktor der Empfänger-Spule  $\xi$  und die Rauschgröße des Vorverstärkers  $F$ .

Damit ist die quantitative NMR-Spektroskopie eine Relativmethode und kann zur Analyse von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen bei Vielstoffgemischen eingesetzt werden. Bei Zuwaage eines Standards sind Reinheitsanalysen sowie Konzentrations- und Gehaltsbestimmungen durchführbar. Als Vorteil gegenüber anderen analytischen Verfahren wird in vielen Publikationen herausgestellt, dass NMR-Analysen einfach handhabbar, kalibrierfrei, zerstörungsfrei und schnell sind. Ferner ist allgemein keine Aufarbeitung oder Isolierung des Analyten nötig sowie wegen der ausgezeichneten Selektivität der NMR-Spektroskopie die gleichzeitige Analyse mehrerer Analyten in einem Gemisch möglich. Als Nachteile sind gegebenenfalls Sättigungs- und Überlauf-Probleme sowie relativ hohe Anschaffungs- und Betriebskosten zu erwähnen [20].

### 3.1 Primäre Methode

Um all die Messgrößen und -methoden, von denen es heute eine Vielzahl gibt, miteinander vergleichen zu können, ist es wichtig, sie auf Einheitsnormale zurückzuführen. Das Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) führte dazu das Konzept der primären Methoden ein. Dieses wurde für das CCQM wie folgt definiert:

A primary method of measurement is a method having the highest metrological qualities, whose operation can be completely described and understood, for which a complete uncertainty statement can be written down in terms of SI units.

A primary direct method: measures the value of an unknown without reference to a standard of the same quantity.

A primary ratio method: measures the value of ratio of an unknown standard of the same quantity; its operation must be completely described by a measurement equation. (Milton und Quinn, S. 293 [12])

Bisher sind die Coulometrie, die Gravimetrie, die Titrimetrie und die kolligativen Methoden als direkte und die Isotopenverdünnungs-Massenspektroskopie als relative primäre Methoden vom CCQM anerkannt [21]. Die Entscheidung, ob eine Methode direkt oder relativ primär ist, wird zum einen entsprechend der Definition über die Notwendigkeit der Referenzierung auf einen Standard entschieden. Ein weiteres, wichtiges Kriterium ist der Einfluss der empirischen Faktoren im Unsicherheitsbudget. Dominieren diese Faktoren, so handelt es sich nicht um eine direkte primäre Methode. Bei der Bestimmung von Relativgrößen (Stoffmengenverhältnis, -anteil) ist die NMR-Spektroskopie wegen ihrer metrologi-

schen Qualität (Einfluss der Integration) offensichtlich beschränkt und daher nur als relative primäre Methode anzusehen. Für die Bestimmung von Absolutgrößen (Reinheit, Konzentration, Gehalt) diskutierte Jancke [9], dass die quantitative NMR-Spektroskopie der Definition einer relativen primären Methode entspricht.

Die Messunsicherheit der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie für die Stoffmengenanteil-Analyse wurde in der eigenen Diplomarbeit [14] untersucht. Daran anknüpfend sollen hier

1. die Messgleichungen
2. die Unsicherheitsbudgets und
3. die metrologische Qualität mit Hilfe von Ringversuchen

für die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten der quantitativen NMR bestimmt werden.

### 3.2 Single-Pulse-Experimente

Das Single-Pulse (SP)-Experiment ist das einfachste anzuwendende NMR-Experiment, dessen zeitlicher Ablauf in der Abbildung 3.1 dargestellt ist.

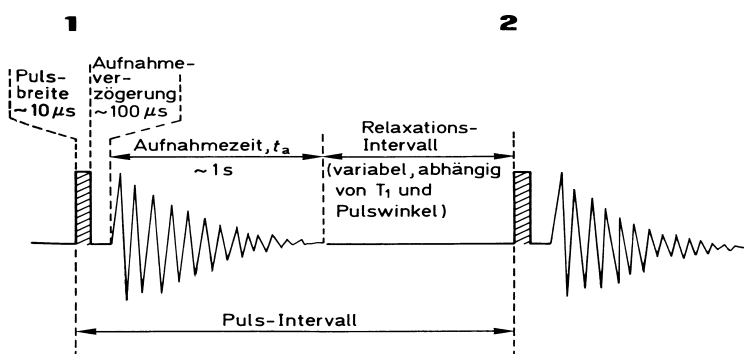


Abbildung 3.1: Zeitsequenz eines Impulses (1) in einem SP-NMR-Experiment mit Datenakkumulation. Nach Ablauf einer Zeitsequenz  $\tau$  (Puls-Intervall) erfolgt der nächste Impuls (2) (entnommen aus [16]).

Durch den Anregungsimpuls erfährt die Magnetisierung eine Auslenkung aus ihrer Ruhelage (z-Magnetisierung) in Richtung der x,y-Ebene. Die zeitliche Abnahme der y-Magnetisierung (transversale oder Quermagnetisierung) aufgrund der  $T_2$ -Relaxation des Systems wird als Free Induction Decay (FID) bezeichnet und aufgenommen. Die Fourier-Transformation des FIDs liefert das auszuwertende Spektrum. Validierungen der  $^1\text{H}$ -SP-NMR zeigten [8, 14], dass die Methode gegenüber den meisten Parametern robust ist. Lediglich die Aufnahmezeit und das  $T_1$ -Relaxationsintervall sind zu optimieren. Im Rahmen der eigenen Validierung der Methode zeigte sich, dass bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) von mindestens 150 eine relative Messunsicherheit von unter 1,5 % erreichbar ist [14]. Eine Aufgabe dieser Arbeit ist es, dieses allgemein für alle quantitativen Anwendungen der NMR zu zeigen.

Die Erkenntnisse aus der Validierung sind allgemein auf SP-Experimente mit anderen Kernen (z.B.  $^{31}\text{P}$  und  $^{13}\text{C}$ ), der Festkörper MAS-Technik und der Low-Resolution-NMR übertragbar.

Für die Betrachtung weiterer quantitativer Anwendungen ist es nötig, den Einfluss aller Parameter auf die Ergebnisgenauigkeit zu untersuchen. Daher werden diese in den folgenden drei Kapiteln kurz erläutert.

### 3.2.1 Aufnahme-Parameter

Eine wichtige Voraussetzung für den Ablauf eines NMR-Experiments ist die gute Auflösung des Spektrometers, um schmale Signale zu erhalten. Das Homogenisieren des Magnetfeldes zur optimalen Auflösung nennt man Shimmen. Den Ablauf der Aufnahme des FIDs beeinflussen mehrere Parameter. Mit Hilfe des Parameters Receiver Gain (RG) wird die Auflösung des Analog-Digital-Wandlers (ADC) für die zu untersuchende Probe optimiert. Bei quantitativen Analysen von sehr großen Signalamplitudenunterschieden ist es wichtig, den dynamischen Bereich optimal auszunutzen [22]. Für die Anregung des Spektrums ist die Kenntnis der Parameter des  $90^\circ$ -Impulses (Impulsstärke und -länge) erforderlich. Diese über das Intensitätsmaximum bei  $90^\circ$  zu bestimmen, kann zu falschen Werten führen [23]. Genauer wird der  $180^\circ$ - oder  $360^\circ$ -Nulldurchgang festgelegt. Direkt nach der Anregung findet bereits Emission statt, die während der Aufnahmeverzögerung nicht detektiert wird. Dadurch wirken sich unterschiedliche  $T_2$ -Zeiten (Transversale Relaxation) der einzelnen Strukturgruppen auf die Richtigkeit<sup>1</sup> negativ aus [24], während bei Signalen mit ungefähr gleichen Halbwertsbreiten (ähnliche  $T_2$ -Zeiten) die Variation der Aufnahmeverzögerung keinen Einfluss auf die Richtigkeit ausübt [14]. Die darauffolgende Aufnahme des FIDs (Aufnahmezeit) ist zu optimieren. Eine zu kurze Aufnahmedauer verringert wegen des zu frühen Abschneiden des FIDs die Richtigkeit und Präzision<sup>2</sup> der Analyse, ebenso eine zu lange Aufnahmezeit aufgrund der alleinigen Aufnahme von Rauschen [25]. Eine zu kurze Zeitsequenz  $\tau$ , auch Puls-Intervall oder Repetition time genannt, beeinflusst bei Datenakkumulation in Abhängigkeit von den  $T_1$ -Zeiten die Intensitätswiedergabe durch Sättigungseffekte. Den erreichten Grad der Sättigung beschreibt die folgende Gleichung [26]:

$$M_z = M_0 \left( 1 - e^{-\tau/T_1} \right). \quad (3.7)$$

Um den Fehler der Intensitätswiedergabe durch Sättigung kleiner als 0,1 % relativ zu halten, ist bei Anregung mit einem  $90^\circ$ -Impuls eine Zeitsequenz von mindestens siebenmal der längsten  $T_1$ -Zeit aller auszuwertenden Signale notwendig [26]. Dazu ist unter Berücksichtigung der Aufnahmezeit das Relaxationsintervall entsprechend lang zu setzen. Ein kleinerer

---

<sup>1</sup> Maß für die Abweichung des Analysenwertes vom (gravimetrischen) Referenzwert.

<sup>2</sup> Maß für die Streuung der Einzelwerte.



Anregungswinkel verkürzt die Zeitsequenz, führt aber gleichzeitig zu einem schlechteren S/N [26, 27]. Ebenso wirkt sich die Veränderung der Scananzahl  $n_s$  (Datenakkumulation) mit  $S/N \sim \sqrt{n_s}$  auf das S/N aus [26].

Bei NMR-Spektrometern sind zwei Arten von Filtern (Analog- und Digitalfilter) gängig, die den außerhalb der eingestellten Spektrenweite<sup>3</sup> angeregten Bereich herausfiltern. Während der Digitalfilter einen fast senkrechten „cut-off“ und somit schmale Grenzen hat, fällt der „cut-off“ beim Analogfilter kurvenförmig ab und besitzt einen breiten Grenzbereich. Die bei modernen NMR-Spektrometern eingesetzte Oversampling-Technik nimmt die Spektren mit maximaler Spektrenweite auf und filtert diesen gesamten Bereich analog. Zusätzlich wird der eingestellte Spektrenbereich mit einem Digitalfilter bearbeitet [28].

### 3.2.2 Prozessierungs-Parameter

Die Konvertierung des analog aufgenommenen FIDs mit dem Analog-Digital-Wandler (ADC) in die digitale Form kann zu systematischen Fehlern bei der Intensitätswiedergabe führen, wenn der dynamische Bereich nicht für die Darstellung schwacher Signale neben intensiven Signalen ausreicht. Ausschlaggebend ist hierfür das letzte Bit, das zwischen Signal oder Rauschen entscheidet [29]. ADCs mit Wortlängen von 12 Bit, 16 Bit oder 18 Bit sind in der Lage, maximale Signalamplituden-Unterschiede von ungefähr 2.000, 30.000 bzw. 130.000 darzustellen [15].

Vor der Fourier-Transformation (FT) wird der FID mit einer Apodizationsfunktion sowie dem Auffüllen mit Nullen (Zero-Filling) zur Verbesserung der Darstellung des Frequenzspektrums mathematisch manipuliert. In der 1D-NMR-Spektroskopie wird routinemäßig als Apodizationsfunktion die exponentielle Multiplikation (em) der Form

$$f(t) \sim e^{-\frac{t}{a}} \quad (3.8)$$

zur Verbesserung des S/N auf Kosten der Auflösung (Signale werden breiter) eingesetzt. Der Faktor „a“ kann über das „line broadening (lb)“ variiert werden. Grundsätzlich hat die em keinen Einfluss auf die Intensitätswiedergabe im Spektrum, jedoch bei dicht beieinanderliegenden Signalen kann durch die Linienverbreiterung die Auswertung wegen Überlagerung unmöglich gemacht werden [14]. Ein lb-Faktor von 0,3 Hz erwies sich im Rahmen der eigenen Validierung als optimal. Die Anwendung der Gauß-Multiplikation als Apodizationsfunktion für die quantitative Auswertung verfälscht nach Herzog und Messerschmidt [30] die Intensitäten im Spektrum.

Um die Intensitäten der Signale im Spektrum richtig wiederzugeben, müssen diese mit mindestens fünf Punkten oberhalb der halben Amplitude dargestellt werden [31, 32]. Bei

---

<sup>3</sup> Wird auch als Spektral-Weite bezeichnet.

einer guten Auflösung des Spektrums ist das nicht immer gegeben. Infolgedessen werden dem FID Punkte mit dem Wert Null dazuaddiert (Zero-Filling), die keine weiteren Informationen in das Spektrum hineinbringen [33]. Generell wird durch das Zero-Filling die Punktdichte im Spektrum erhöht. Dadurch wird eine Verbesserung der Messunsicherheit der Methode erreicht [26, 34].

### 3.2.3 Spektrenkorrekturen und Integration

Das Frequenzspektrum ist nach der Fourier-Transformation hinsichtlich Phase und Grundlinie zu korrigieren. Rabenstein [26] und Grivet [32] zeigten, dass eine ordentliche Korrektur des Spektrums und eine sorgfältige Integration Grundlagen für eine geringe Messunsicherheit der Methode sind. Hierzu ist zuerst das Spektrum in Phase zu bringen. Während gleichgroße frequenzunabhängige Phasenfehler keinen Einfluss auf das Verhältnis der Intensitäten in einem Spektrum ausüben, bewirkt ein frequenzabhängiger Phasenfehler von  $5^\circ$  einen Fehler von 1 % [26]. Die darauffolgende Korrektur der Grundlinie ist ausschlaggebend für richtige Ergebnisse. Abweichungen von einer idealen Grundlinie üben einen Einfluss auf die Richtigkeit der Integration aus. Die Bestimmung der integralen Signalintensitäten erfolgt routinemäßig mit der elektronischen Integration. Dabei ist die Setzung der Integralgrenzen von den Halbwertsbreiten der auszuwertenden Signale abhängig. Um 99 % der Gesamtintensität eines Signals mit einem Integral zu erfassen, müssen dessen Integrationsgrenzen 64 mal der Halbwertsbreite gesetzt werden; zur Erfassung von 99,9 % sogar 636 mal. Dieser Faktor ist innerhalb eines Spektrums konstant anzuwenden, um Intensitätsverhältnisse mit hoher Richtigkeit zu bestimmen. Er wird in dieser Arbeit als „Integrationsfaktor“ bezeichnet. Geringe Abweichungen von einer optimalen Phase oder Grundlinie – zu Erkennen an nicht geraden An- und Ausläufen der Integralzüge – können mit Hilfe der Korrekturfunktion BIAS und SLOPE am Integralzug ausgeglichen werden. Mit BIAS wird dabei die Grundlinie in der Vertikalen verändert und mit SLOPE die Steigung der Grundlinie beeinflusst. Integralzüge mit geradem An- und Auslauf geben die Intensität eines Signals richtig wieder.

## 3.3 Multi-Pulse-Experimente

Im Gegensatz zum SP-NMR-Experiment bestehen Multi-Pulse (MP)-Experimente aus mindestens zwei Impulsen. Bei den in dieser Arbeit betrachteten MP-Sequenzen wird der zweite Impuls bzw. mehrere Impulse entweder vor dem Anregungsimpuls (Presaturation, LC1WET), nach dem Anregungsimpuls (Watergate) oder auf einem zweiten Einstrahlkanal zeitgleich zum Anregungsimpuls ( $^{13}\text{C}$ -NMR mit Entkopplung) eingesetzt.

### 3.3.1 Lösungsmittelunterdrückung (Solvent Suppression)

Vor allem bei wässrigen Lösungen ist es oftmals der Fall, dass der dynamische Bereich zur Darstellung schwacher Signale neben dem intensiven Wassersignal nicht ausreicht. Für die

Lösung dieses Problems wurden eine Reihe von verschiedenen Techniken entwickelt, die das Wassersignal unterdrücken [19]. Generell lassen sich diese Techniken in zwei Kategorien einteilen: *preacquisition methods* und *postacquisition methods* [35]. Dabei verbessern nur erstere den dynamischen Bereich durch die Unterdrückung des Wassersignals.

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Unterdrückungsmethoden (Presaturation, Watergate, LC1WET) gehören zu den *preacquisition methods*, deren relevanten Grundlagen hier kurz beschrieben werden. Einen allgemeinen Überblick über Lösungsmittelunterdrückung und verschiedene Techniken dazu gibt die Arbeit von Gueron et al. [36] wieder.

### 3.3.1.1 Presaturation

Die Presaturation – Vorsättigen des Wassersignals – ist die einfachste Lösungsmittelunterdrückungs-Technik [19], deren zeitlicher Ablauf in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Mit einem schwachen Radiofrequenzimpuls wird selektiv das Wassersignal direkt vor dem 90°-Anregungsimpuls gesättigt.

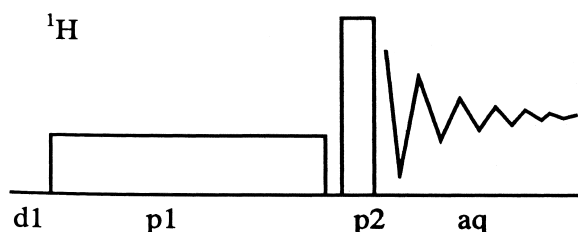


Abbildung 3.2: Zeitlicher Ablauf der Presaturation-Pulssequenz (entnommen aus [37]).

Um eine gute Wassersättigung zu erreichen, ist neben einer guten Auflösung des Spektrometers eine Sättigungsdauer von 2 s bis 3 s notwendig, um die Populationsdifferenz aufzuheben. Ferner kann mit der Impulsstärke des Sättigungsimpulses der Sättigungsbereich verändert werden. Eine höhere Impulsleistung führt zur besseren Sättigung aufgrund eines breiteren Sättigungsbereiches. Hingegen ist für eine hohe Selektivität ein minimaler Sättigungsbereich nötig. Folgerichtig muss ein Optimum zwischen Selektivität und Güte der Sättigung gefunden werden. In der Literatur sind hierfür als Richtwerte Sättigungsbreiten von 20 Hz [15] bzw. 25 Hz [37] angegeben.

### 3.3.1.2 Watergate

Die Watergate-Sequenz zur Wasserunterdrückung gehört seit der routinemäßig eingesetzten Gradiententechnik mit zu den am meisten eingesetzten Methoden [19]. Die zwischen dem Anregungsimpuls und der Aufnahmezeit eingebettete Pulssequenz besteht, wie in Abbildung 3.3 dargestellt, aus zwei identischen Gradientenimpulsen (Gauß-Shape), die eine 180°-Spinecho-Sequenz aus drei Pulspaaren (3-9-19) umschließen.

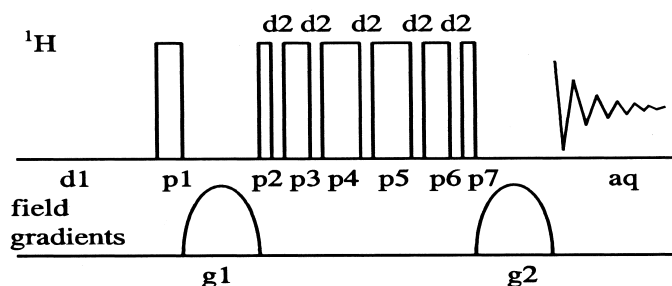


Abbildung 3.3: Zeitlicher Ablauf der Watergate-Pulssequenz (entnommen aus [37]).

Die durch den Anregungsimpuls aufgebaute transversale Magnetisierung wird durch den ersten Gradientenimpuls dispergiert und anschließend durch die kombinierten Effekte der Spinecho-Sequenz und des zweiten identischen Gradientenimpulses mit Ausnahme des Wassersignals refokussiert. Insgesamt wird durch die selektive Dephasierung des Wassersignals eine exzellente Wasserunterdrückung bewirkt [38]. Aufgrund der eingesetzten Binomial-Sequenz findet diese selektive Dephasierung zusätzlich in Abständen von  $1/(2 \cdot d2)$  statt. Um richtige Intensitäten im Spektrum zu erhalten, ist die zeitliche Symmetrie zwischen den beiden Gradientenimpulsen aufgrund der Spin-Echo-Sequenz von großer Bedeutung. Nachteilig wirkt sich die Watergate-Sequenz auf in der Nähe des Wassersignals liegende Signale durch partielle Unterdrückung aus [39].

### 3.3.1.3 LC1WET

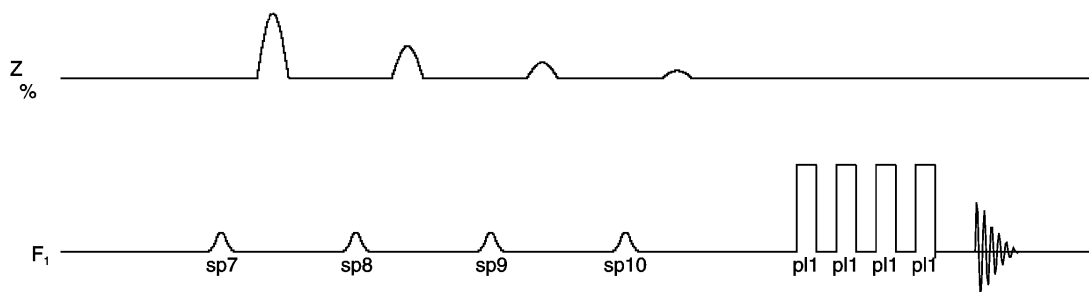


Abbildung 3.4: Zeitlicher Ablauf der LC1WET-Pulssequenz. Erstellt mit XWinNMR-Software („ppg“).

Die Sequenz besteht aus einer WET-Pulsfolge von Gauß-geshapten Anregungsimpulsen geringer Anregungsbreite und Anregungswinkeln von  $81,4^\circ$ ,  $101,4^\circ$ ,  $69,3^\circ$  und  $161,0^\circ$ . Dabei regt jeder Impuls selektiv das Wassersignal an, dessen aufgebaute transversale Magnetisierung durch den darauffolgenden Gradientenimpuls dispergiert wird. Durch die viermalige Anwendung wird eine gute Wasserunterdrückung erreicht. Dabei wird die Inhomogenität des  $B_1$ -Magnetfeldes reduziert und wegen der unterschiedlichen Gradientenimpulsstärken von  $8:4:2:1$  ein Gradientenecho verhindert. Die darauffolgende Composite-Pulsfolge  $90_x$ ,  $90_y$ ,  $90_{-x}$ ,  $90_{-y}$  trägt zu einer weiteren Unterdrückung des Wassersignals sowie ebenfalls zur Reduzierung der Inhomogenität des Magnet-Feldes bei [40].

### 3.3.2 $^1\text{H}$ -Breitband-Entkopplung in der $^{13}\text{C}$ -NMR

$^{13}\text{C}$ -SP-NMR-Spektren zeigen neben  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen zusätzlich  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen, die das Spektrum komplex und linienreich machen. Obendrein werden die ohnehin schon schwachen Intensitäten (geringe natürliche Häufigkeit) durch Aufspaltung der Resonanzlinien in Multipletts um ein Vielfaches verringert. Mit der  $^1\text{H}$ -Breitband (BB)-Entkopplungstechnik werden die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen aufgehoben. Hierbei wird mit Composite-Pulsen (WALTZ-16) über einen zweiten Sendekanal auf den gesamten Protonenfrequenzbereich kontinuierlich eingestrahlt. Man erhält somit ein  $^1\text{H}$ -entkoppeltes  $^{13}\text{C}$ -Spektrum, das generell schmale und intensive Singulett-Signale zeigt. Durch die Entkopplungs-Einstrahlung auf die Protonen wird außerdem ein NOE-Effekt erzeugt, der sich auf die zu messenden  $^{13}\text{C}$ -Spins als Intensitätsänderung auswirkt. Dieses führt dazu, dass im Gegensatz zur SP-NMR die Spektrometerkonstante  $k_S$  bei der  $^1\text{H}$ -BB-entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR nicht mehr für alle Resonanzen konstant ist, sondern u.a. von  $T_I$  abhängig ist [41]:

$$k_S = k_0(1 + \eta) \cdot \left( \frac{1 - e^{-\frac{\tau}{T_I}}}{1 - \cos \alpha \cdot e^{-\frac{\tau}{T_I}}} \right) \cdot \sin \alpha. \quad (3.9)$$

Dabei ist  $k_0$  die nur von apparativen Faktoren abhängige Konstante und  $\eta$  der Kern-Overhauser-Verstärkungsfaktor. Die Größen  $\eta$  und  $T_I$  können je nach Bindungszustand und Molekülgröße für die einzelnen  $^{13}\text{C}$ -Kerne verschiedene Werte annehmen. Um innerhalb des Spektrums ein konstantes  $k_S$  zu erhalten, müssen nach Gleichung (3.9) die folgenden drei Forderungen erfüllt werden: Erstens muss  $\eta$  (NOE-Effekt) vernachlässigbar gering werden, damit der Term  $(1 + \eta)$  gleich eins wird. Dieses wird mit der Inverse Gated  $^1\text{H}$ -Decoupling- $^{13}\text{C}$ -NMR-Pulssequenz erreicht, bei der zur Minimierung des NOE-Effektes nur während der Anregungs- und Aufnahmezeit entkoppelt wird (die zeitliche Abfolge der Pulssequenz ist in Abbildung 3.5 dargestellt).

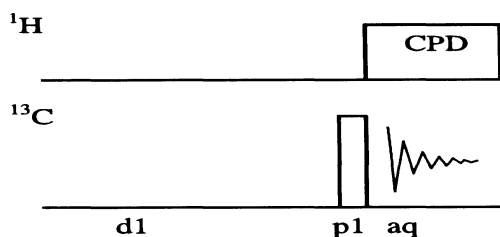


Abbildung 3.5: Zeitlicher Ablauf der Inverse Gated  $^1\text{H}$ -Decoupling- $^{13}\text{C}$ -Pulssequenz (entnommen aus [37]).

Je kürzer dabei die Einstrahldauer des Entkopplerpulses ist, umso geringer wird der auftretende NOE-Effekt. Dazu ist eine möglichst kurze Aufnahmezeit zu wählen. Zweitens ist ein möglichst großes Verhältnis zwischen der Zeitsequenz  $\tau$  und den  $T_I$ -Zeiten zu erreichen, damit die e-Funktionen gegen Null und der Quotient gegen eins streben. Bei schnell

relaxierenden C-Atomen, die direkt mit Protonen gebunden sind, ist  $\tau$  gleich  $6,8 \cdot T_1$  und bei quartären C-Atomen gleich  $4,6 \cdot T_1$  zu setzen. Bei unbekannten  $T_1$ -Zeiten sollte generell eine Zeitsequenz von 300 s eingestellt werden [42]. Drittens ist mit einem Anregungswinkel von  $90^\circ$  zu arbeiten, damit der Sinus-Term gleich eins wird [42]. Ferner führt die Zugabe von Relaxationsreagenzien zur Minimierung von  $\eta$  und  $T_1$  [41, 43].

### 3.4 Kern-Overhauser-Effekt

Als Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect, NOE) bezeichnet man die Intensitätsänderung eines beobachteten Signals bei Einstrahlung auf eine andere Resonanzlinie. Hierdurch können  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale bei der  $^1\text{H}$ -BB-Entkopplung bis zu 200% an Intensität gewinnen [17]. Der Grad der Intensitätsänderung wird mit dem Verstärkungsfaktor  $\eta$  charakterisiert, der wie folgt definiert ist [15]:

$$\eta = \frac{I - I_0}{I_0} \quad (3.10)$$

Dabei geben  $I$  bzw.  $I_0$  die Intensitäten mit und ohne Einstrahlung auf einen anderen Kern wieder. Veranschaulichen lässt sich die Wirkungsweise vom NOE-Effekt an einem heterogenen Zweispinsystem AX ohne Spin-Kopplung. Der auftretende NOE-Effekt ist nicht an skalare Kopplungen zwischen den Kernen A und X gebunden, sondern wirkt sich über den Raum aus, wobei die Effizienz der Übertragung zum Abstand zwischen eingestrahlt und beobachtetem Kern mit  $1/r^6$  proportional ist [16].

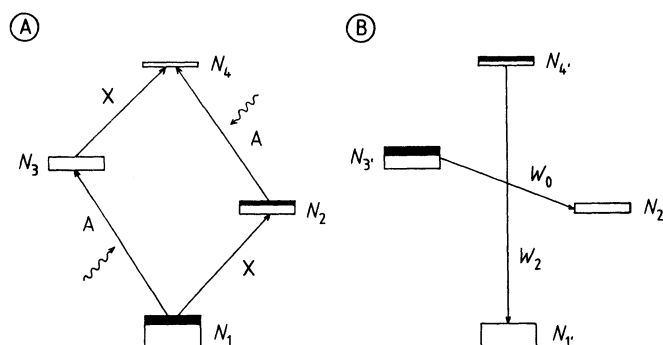


Abbildung 3.6: Energieniveauschemas zur Darstellung des NOE-Effekts bei einem AX-System. A: Ausgangszustand; B: Zustand nach Sättigung der A-Übergänge.  $W_0$  und  $W_2$  stellen die Übergangswahrscheinlichkeiten der Null- und Doppelquantenübergänge durch Relaxation dar (entnommen aus [17]).

Ausgehend vom Ausgangszustand eines AX-Spin-Systems, dargestellt in Abbildung 3.6A, wird bei Einstrahlung auf Kern A ein Zustand der Sättigung erreicht (Abbildung 3.6B). Durch die zeitgleich stattfindenden, bei Sättigung erlaubten Übergänge  $W_0$  (Nullquanten-Übergang) und  $W_2$  (Doppelquantenübergang) zusätzlich zu den Einquantenübergängen wird eine vom Gleichgewicht abweichende Besetzungsverteilung erreicht, die sich auf die Intensität des X-

Kernes auswirkt. Mit  $W_2$  größer als  $W_0$  wird die Intensität des beobachteten X-Kernes verstärkt (kleine Moleküle), während ein größerer Beitrag von  $W_0$  zu einer Intensitätsverminderung führt (große Moleküle) [44]. Diese Relaxationen werden als Kreuzrelaxation bezeichnet. Bei Mehrspinsystemen, z.B. einem linearen Dreispinsystem A-B-C tritt bei Einstrahlung auf Kern A ein positiver NOE bei B auf, bei C ist zudem ein negativer NOE erkennbar. Dieser Effekt wird als indirekter NOE bezeichnet, da er nicht direkt durch die Einstrahlung auf A bewirkt wird, sondern auf die Änderung des Besetzungsverhältnisses bei B zurückzuführen ist. Dagegen tritt bei einem gewinkelten A-B-C-Dreispinsystem bei Einstrahlung auf A ein positiver direkter NOE bei C ein [16].

### 3.5 Bestimmung von Relativgrößen

Die Bestimmung von relativen Intensitätsverhältnissen innerhalb eines Spektrums mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektroskopie ist die einfachste quantitative Anwendung, da bis auf das Überführen ins NMR-Röhrchen und das Lösen bzw. Verdünnen des Analyten in einem geeigneten Lösungsmittel keine weitere Probenpräparation notwendig ist. Unter der Bedingung einer konstanten  $k_s$  über die gesamte Spektrenweite kann nach Gleichung (3.1) aus dem Verhältnis der normierten Intensitäten je eines Signals von zwei Komponenten X und Y das Verhältnis der Stoffmengen der beiden Komponenten direkt berechnet werden:

$$\frac{n_X}{n_Y} = \frac{I_X}{I_Y} \cdot \frac{N_Y}{N_X} . \quad (3.11)$$

Des Weiteren ist es möglich, den Stoffmengenanteil einer Komponente X in einer Mehrkomponentenlösung direkt aus den Intensitäten aller  $m$  Komponenten – ohne Betrachtung des Lösungsmittels – nach folgender Gleichung zu bestimmen:

$$\frac{n_X}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{I_X / N_X}{\sum_{i=1}^m I_i / N_i} \cdot 100\% . \quad (3.12)$$

Ein großer Vorteil der NMR-Spektrometrie besteht darin, dass von jeder zu bestimmenden Komponente nur ein eindeutig zugeordnetes Signal ausgewertet werden muss.

### 3.6 Bestimmung von Absolutgrößen

Da die NMR-Spektroskopie eine Relativmethode ist, muss ein Standard bekannter Reinheit dazugewogen werden, um durch den Bezug auf diesen eine absolute Messgröße wie den Gehalt oder die Konzentration berechnen zu können. Hierbei handelt es sich nach DKD-4 [45] um eine Ein-Punkt-Kalibrierung. Um die metrologische Qualität des Ergebnisses des Analysenverfahrens zu bestätigen, spielen hier zertifizierte Referenzmaterialien (ZRM) eine große Rolle [3]. Nur durch diese ist eine Rückführung auf die SI-Einheiten und somit der

Nachweis der Richtigkeit gegeben [46]. Anstelle eines ZRMs kann auch ein auf ein ZRM zurückgeführter Standard eingesetzt werden.

### 3.6.1 Standards

In der Literatur finden sich eine Anzahl von Standards, die zu quantitativen NMR-Analysen eingesetzt wurden. Damit eine Substanz sich als Standard für die quantitative NMR-Spektroskopie eignet, sollte sie nach Wells und Cheung [47] folgende Eigenschaften haben: leichte Verfügbarkeit in reiner Form, billig, stabil, löslich sowohl in organischen als auch wässrigen Lösungsmitteln, nicht-hygroscopisch, chemisch inert, geringer Dampfdruck und möglichst wenig Resonanzlinien. Letzteres wird auch von Griffiths und Irving [48] für einen idealen Standard gefordert. Larive [49] diskutierte den großen Vorteil der quantitativen NMR gegenüber vielen anderen spektroskopischen Methoden, der darin besteht, dass zur Quantifizierung kein Standard mit hohem Reinheitsgrad benötigt wird. Jeder primäre analytische Standard könne eingesetzt werden, sofern seine Reinheit bekannt ist und seine Verunreinigungen die Analyse nicht behindern. Als optimal für eine hohe Richtigkeit ist ein Intensitätsverhältnis von ungefähr eins im Spektrum zwischen den auszuwertenden Signalen von Analyt und Standard [22].

Bei der Verwendung von Standards unterscheidet man zwischen internen Standards, die der Lösung direkt beigemessen werden, und externen Standards. Letzteres kann entweder mit einem zweiten NMR-Röhrchen, nacheinander im selben NMR-Röhrchen oder aber mit einer im Mess-Röhrchen befindlichen Kapillare gemeinsam erfolgen. Während interne Standards eine einfachere Handhabung des Verfahrens und der Berechnung aufweisen, wird beim zweiten Verfahren die Kontamination der Analytlösung mit dem Standard vermieden. In dieser Arbeit wird wegen der einfacheren Handhabung und daraus resultierend dem einfacheren Unsicherheitsbudget nur mit internen Standards verfahren.

Eine weitere Möglichkeit von Standards zeigten Akoka et al. [50] und Silvestre et al. [51] mit der ERETIC-Methode (Electronic REference To access In vivo Concentrations). Hierbei wird als Standard ein künstlich erzeugter pseudo-FID über eine zweite Senderspule elektronisch zum FID eingespeist. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Signal an jede beliebige Stelle im Spektrum hingestellt werden kann. Nachteilig wirkt sich die schlechte Präzision aus. Über einen Zeitraum von einem Monat betrug die Streuung der Kalibrierungen 3 %.

### 3.6.2 Reinheitsbestimmung

Generell existieren zwei Möglichkeiten der Reinheitsanalyse, die der direkten Analyse über die Hauptkomponente und die der indirekten Analyse über die Verunreinigungen.



Bei der direkten NMR-Analyse wird die Hauptkomponente gegen einen internen Standard ausgewertet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nur die eindeutige Zuordnung eines optimal auszuwertenden Signals der Hauptkomponente notwendig ist. Die Kenntnis über die Zusammensetzung bzw. die qualitative Zuordnung der Fremdsignale ist dabei allgemein nicht erforderlich. Für die Bestimmung des Reinheitsgrades der Hauptkomponente sind Analyt und Standard einzuwiegen ( $m_{Anl}$ ,  $m_{Std}$ ) und die Intensität der Hauptkomponente  $I_{Anl}$  (ohne Verunreinigungen) gegen die Intensität des Standards  $I_{Std}$  auszuwerten. Aus dem Intensitätsverhältnis kann unter Berücksichtigung der zur Resonanz der ausgewerteten Signale beitragenden Kernanzahl ( $N_{Anl}$ ,  $N_{Std}$ ), der Molmassen ( $M_{Anl}$ ,  $M_{Std}$ ) und Einwaagen von Standard und Analyt sowie des Reinheitsgrades des Standards  $P_{Std}$  der Reinheitsgrad des Analyten  $P_{Anl}$  (in g/g %) wie folgt berechnet werden:

$$P_{Anl} = \frac{I_{Anl}}{I_{Std}} \cdot \frac{N_{Std}}{N_{Anl}} \cdot \frac{M_{Anl}}{M_{Std}} \cdot \frac{m_{Std}}{m_{Anl}} \cdot P_{Std} \quad (3.13)$$

Im Gegensatz zur direkten Analyse sind bei der indirekten alle Verunreinigungen zu identifizieren, deren Signale im Spektrum qualitativ zuzuordnen und quantitativ gegen einen Standard auszuwerten. Die Berechnung des Reinheitsgrades des Analyten erfolgt dabei als Differenz zu 100%. Das Problem dabei ist, dass nicht detektierbare Verunreinigungen (z.B. anorganische Salze für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR) bei der Berechnung des Reinheitsgrades nicht erfasst werden.

Für eine Analyse mit hoher Richtigkeit ist bei nicht genauer Kenntnis der enthaltenen Verunreinigungen die direkte Methode über die Hauptkomponente die bessere Wahl und wird deswegen in dieser Arbeit verwendet. Nur wenn die qualitative Zusammensetzung der Substanz bekannt ist, führt der zweite Weg ebenfalls zu einem richtigen Ergebnis. Die Obergrenze für einen bestimmbaren Gehalt des Hauptbestandteils ist von der Unsicherheit der Methode abhängig [52].

### 3.6.3 Gehaltsanalyse

Bei der Gehaltsanalyse wird der Gehalt eines Analyten in einer Matrix bestimmt. Hierfür ist bei der NMR-Spektroskopie die Analyse auf einen Standard mit bekanntem Reinheitsfaktor zurückzuführen. Die Vorgehensweise entspricht der direkten Reinheitsbestimmung mit einer ähnlichen Messgleichung, die wie folgt aussieht:

$$k_{Anl} = \frac{m_{Anl}}{m_{Matrix}} = \frac{I_{Anl}}{I_{Std}} \cdot \frac{N_{Std}}{N_{Anl}} \cdot \frac{M_{Anl}}{M_{Std}} \cdot \frac{m_{Std}}{m_{Matrix}} \cdot f_{Std} \quad (3.14)$$

wobei  $m_{Matrix}$  die Einwaage der Analytlösung (Matrix) und  $f_{Std}$  den Reinheitsfaktor des Standards wiedergibt.

## 4 Unsicherheitsbetrachtung

Die ISO/IEC 17025 [53] schreibt vor, Analysenergebnisse mit einer Messunsicherheit anzugeben. Ferner wird durch die Definition einer primären Methode ein vollständiges Unsicherheitsbudget zur Angabe der Messunsicherheit gefordert. Es sollen daher die Unsicherheitsbudgets für die vier in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen quantitativen Anwendungsmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie dargestellt werden. Zugrunde gelegt werden dazu die Leitfäden von ISO [11], der sogenannte GUM, und EURACHEM [55].

### 4.1 Allgemeines Verfahren zur Berechnung der Messunsicherheit

Die Messunsicherheit eines Verfahrens oder einer Methode setzt sich aus den Standardunsicherheiten der Eingangsgrößen  $x_1, x_2, \dots, x_n$  zusammen, die in der kombinierten Standardunsicherheit  $u_c(y)$  einer Messgröße in Abhängigkeit von den Eingangsgrößen  $y(x_1, x_2, \dots, x_n)$  erfasst und schließlich als erweiterte Messunsicherheit  $U$  mit dem betrachteten Grad des Vertrauens  $p$  und dem Erweiterungsfaktor  $k$  angegeben werden.

Bei der Betrachtung der Standardunsicherheiten von Eingangsgrößen unterscheidet GUM nach solchen, deren Werte statistisch ermittelt wurden (Typ A), und solchen, die nicht aus mehrmaligen Beobachtungen gewonnen wurden (Typ B).

Für die Berechnung der Standardunsicherheit  $u(x_i)$  nach Typ A gilt, dass sie gleich der Standardabweichung  $s(\bar{x}_i)$  des aus  $n$  unabhängigen Werten gebildeten Schätzwertes  $\bar{x}_i$  (arithmetischer Mittelwert) ist. Dabei kennzeichnet die Standardabweichung eines Schätzwertes die Streuung der beobachteten Werte um den Schätzwert:

$$u(x_i) = s(\bar{x}_i) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_{i,k} - \bar{x}_i)^2}{n \cdot (n-1)}}. \quad (4.1)$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade  $f_i$  von  $u(x_i)$  ist bei  $n$  Messungen gleich  $n-1$ .

Standardunsicherheiten vom Typ B können z.B. aus den Angaben der Hersteller, Daten von Zertifikaten oder Kalibrierscheinen übernommen werden. Ist diese dabei als ein Vielfaches einer Standardabweichung bzw. als erweiterte Messunsicherheit angegeben, so errechnet sich die Standardunsicherheit als Quotient aus dem angegebenen Wert und dem Multiplikationsfaktor.

Die kombinierte Standardunsicherheit  $u_c(y)$  einer Messgröße  $y(x_1, x_2, \dots, x_n)$  in Abhängigkeit von den Eingangsgrößen  $x_i$  berechnet sich im Falle unkorrelierter Eingangsgrößen als positive Quadratwurzel aus der Quadratsumme aller Unsicherheitsbeiträge  $u(y, x_i) = c_i u(x_i)$  der  $n$  Eingangsgrößen [11]:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 \cdot u(x_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n u(y, x_i)^2} \quad (4.2)$$

Dabei beschreiben die  $c_i$ , gegeben durch die partiellen Ableitungen  $\partial y(x_1, x_2, \dots, x_n) / \partial x_i$ , die Variation des Ausgangsgrößenwertes  $y$  bei Veränderung der Werte für die Eingangsgrößen  $x_1, x_2, \dots, x_n$  und werden als Empfindlichkeitskoeffizienten bezeichnet [11]. Für den Fall, dass die Eingangsgrößen nur als Produkte oder Quotienten in der Messgleichung auftreten (z.B.  $y = x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n$ ), vereinfacht sich Gleichung 4.2 nach GUM [55, Kapitel 8.2.6, Regel 2] zu folgender Form:

$$u_c(y) = y \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{u(x_i)}{x_i} \right)^2}, \quad (4.3)$$

wobei  $u(x_i)/x_i$  die relativen Unsicherheiten der Eingangsgrößen  $x_1, x_2, \dots, x_n$  beschreiben. Nach der Empfehlung des GUM (genauer: nach der dort zitierten Empfehlung INC-1 (1980), Absatz 5 einer internationalen Arbeitsgruppe zur Angabe von Unsicherheiten) ist die Messunsicherheit mit einem Grad des Vertrauens  $p$  anzugeben, der den Bereich um das Messergebnis angibt, mit dem ein  $p$ -entsprechender Anteil der Verteilung der Werte umfasst wird, die der gemessenen Größe sinnvollerweise zugeordnet werden können [11]. Dieses zusätzliche Maß der Unsicherheit wird als erweiterte Unsicherheit  $U$  bezeichnet. Durch Multiplikation der kombinierten Standardunsicherheit mit einem Erweiterungsfaktor  $k$  erhält man die erweiterte Unsicherheit:

$$U = k \cdot u_c(y). \quad (4.4)$$

Als Erweiterungsfaktoren werden Faktoren von  $k = 2$  oder  $k = 3$  allgemein verwendet, die als Schätzwert ein Konfidenzniveau von  $p = 95 \%$  bzw.  $p = 99 \%$  angeben. Diese Schätzung gilt jedoch nur für eine große Anzahl von Mehrfachmessungen. Ist diese Anzahl  $n$  kleiner als 10 [54], so ist der effektive Freiheitsgrad  $f_{eff}$  einer kombinierten Standardunsicherheit nach der Welch-Satterthwaite-Formel zu berechnen:

$$f_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{u^4(x_i)}{f_i}}. \quad (4.5)$$

Der Erweiterungsfaktor  $k$  wird dann in Abhängigkeit vom effektiven Freiheitsgrad  $f_{eff}$  und dem beabsichtigten Grad des Vertrauens  $p$  (Konfidenzintervall) aus GUM [11, Tabelle G.2] entnommen.

## 4.2 Unsicherheitsbudget für die quantitative NMR-Spektroskopie

Die Vorgehensweise zur Berechnung der Messunsicherheit eines Analysenergebnisses lässt sich in die folgenden vier Schritte aufgliedern [55]:

1. Spezifikation der Messgröße
2. Identifizierung der Unsicherheitsquellen
3. Quantifizierung der Unsicherheitskomponenten
4. Berechnung der gesamten Unsicherheit.

Der erste Schritt, die Spezifikation der Messgröße in Abhängigkeit der Eingangsgrößen, erfolgte bereits für die vier Anwendungsgebiete der quantitativen NMR im Kapitel 3. Für den zweiten Schritt, der Identifizierung der Unsicherheitsquellen, ist es sinnvoll, in einem Ursachen-Wirkungs-Diagramm die Eingangsgrößen und deren Einflussgrößen gemäß der Gleichung der Messgröße darzustellen. Die Vorgehensweise zum Aufstellen eines solchen Diagramms beschreiben Ellison und Barwick [56] in Übereinstimmung mit der ISO 9004-4 [57]. Für die vier Anwendungen der quantitativen NMR-Spektroskopie erfolgt dies in der Abbildung 4.1.

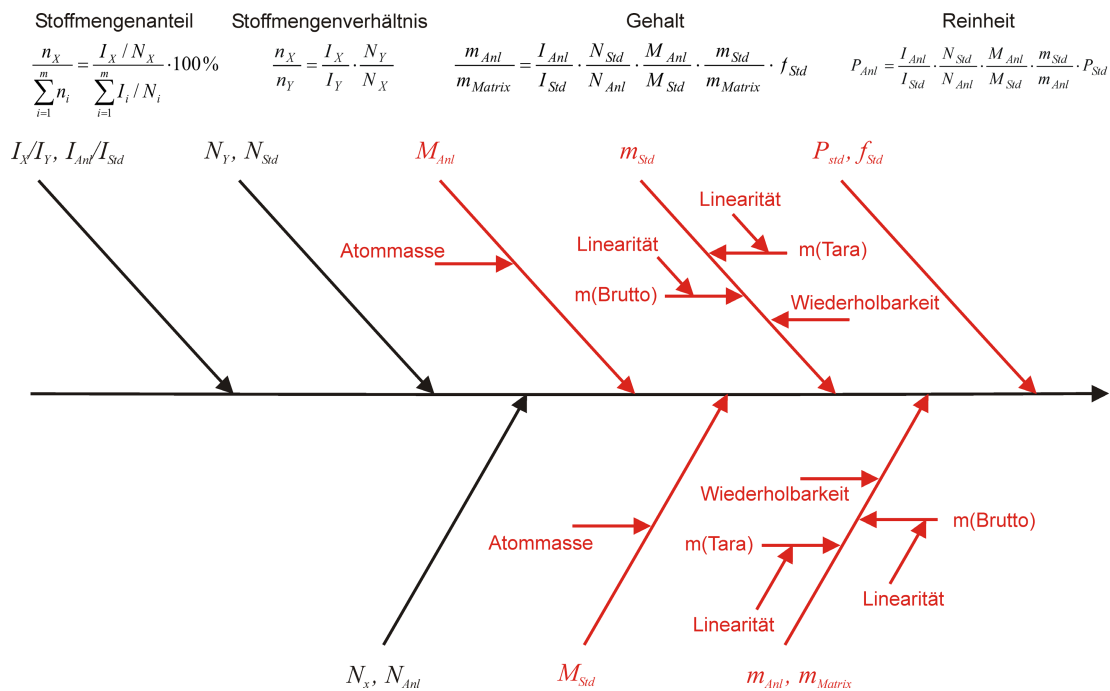


Abbildung 4.1: Ursachen-Wirkungs-Diagramm nach ISO 9004-4. Für die Analyse von Stoffmengenanteilen und -verhältnissen gelten nur die schwarzen Pfeile, für die Gehalts- und Reinheitsbestimmung die schwarzen und die roten Pfeile.

Die einzelnen Unsicherheitsbeiträge der Eingangsgrößen Intensitätsverhältnis (Integration), Anzahl der zur Resonanzlinie beitragenden Kerne  $N_i$ , Molmasse  $M_i$ , Einwaage  $m_i$  sowie Reinheitsgrad  $P_{Std}$  bzw. -faktor  $f_{Std}$  sollen nun näher betrachtet werden.

Die Schritte 3 (Quantifizierung der Unsicherheitskomponenten) und 4 (Berechnung der gesamten Unsicherheit) werden für die Ermittlung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen im Kapitel 5, für die Reinheitsanalyse im Kapitel 6 und für die Gehaltsbestimmung im Kapitel 7 behandelt.

#### 4.2.1 Intensitätsverhältnis (Integration)

Generell kann aus einem NMR-Spektrum nur die Information über das Intensitätsverhältnis erhalten werden, dessen Präzision nach Typ A durch Mehrfachmessungen zu ermitteln ist. Werden die Messungen direkt nacheinander durchgeführt, so erhält man die Wiederholpräzision. Dagegen spricht man von der Vergleichspräzision, wenn die Messungen z.B. zeitlich versetzt mit jeweiligen Shimmen des Systems ausgeführt werden. Die in dieser Arbeit aufgeführten Standardunsicherheiten der Integration geben die Vergleichspräzision wider (Kriterium: unterschiedliche Shim-Zustände). Die Berechnung der Unsicherheit des Intensitätsverhältnisses erfolgt nach Gleichung (4.1), in der nicht nur die Unsicherheit der Integration, sondern die des gesamten Systems der Spektrenaufnahme (Shimmen, Aufnahme, Prozessierung, Spektrenkorrekturen und Integration) berücksichtigt.

#### 4.2.2 Anzahl der zur Resonanzlinie beitragenden Kerne $N$

Die Anzahl von Kernen, die zu einer Resonanzlinie beitragen, sind gemäß der Summenformel einer Substanz eine Integergröße, sofern keine Reaktion stattfindet (z.B. Deuterierung von Protonen durch Lösungsmittel in der  $^1\text{H}$ -NMR). Generell ist für quantitative Analyse mit der NMR-Spektroskopie die Stabilität der auszuwertenden Signale Voraussetzung und mittels Stabilitätsuntersuchungen zu belegen. Eine Unsicherheit ist daher nicht zu betrachten.

#### 4.2.3 Molmasse

Die Standardunsicherheit der Molmasse  $u(M_i)$  wird nach Typ B ermittelt und setzt sich aus den Unsicherheiten der Atommasse gemäß der Summenformel der betrachteten Komponente zusammen. In der Zeitschrift „Pure and Applied Chemistry“ wird von der IUPAC regelmäßig eine Tabelle mit den relativen Atommassen aller Elemente und deren Unsicherheiten veröffentlicht. Da sich die Molmasse als Summe unabhängiger Eingangsgrößen berechnet, wird die Standardunsicherheit der Molmasse nach GUM [55, Kapitel 8.2.6, Regel 1] wie folgt berechnet [58]:

$$u(M_i) = \sqrt{\sum_{j=1}^n (N_j * u(j))^2} . \quad (4.6)$$

Dabei gibt  $N_j$  die Anzahl der Atome des Elements  $j$ ,  $u(j)$  die Standardunsicherheit der Atommasse des Elements  $j$  und  $n$  die Anzahl der vorkommenden verschiedenen Elemente im Molekül wieder. Der Freiheitsgrad wird zu 50 gesetzt.

#### 4.2.4 Einwaage

Die Standardunsicherheit einer Einwaage  $u(m_i)$  wird vor allem durch die Unsicherheiten der Wiederholbarkeit  $u_W(m_i)$  und die der Nichtlinearität  $u_{\text{Nichtlinearität}}(m_i)$  ermittelt, die aus den Herstellerangaben der Waage nach Typ B herangezogen werden können.

Die Unsicherheit der Wiederholbarkeit kann direkt aus dem Datenblatt entnommen werden. Darin ist die Unsicherheit der Ablesegenauigkeit enthalten. Will man die Unsicherheit nach Typ A ermitteln, so ist eine Messreihe von  $n$  Wägungen durchzuführen und die Wiederholpräzision zu berechnen, die als Standardunsicherheit folgendermaßen angegeben wird:

$$u_W(m) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (m_i - \bar{m})^2}{n-1}} \quad (4.7)$$

Die Linearitätsabweichung wird allgemein als maximale Abweichung  $\Delta m$  vom wahren Wert im Datenblatt angegeben. In der Annahme einer gleichmäßigen Verteilung (Rechteckverteilung) wird somit die Unsicherheit der Nichtlinearität wie folgt berechnet:

$$u_{\text{Nichtlinearität}}(m) = \frac{\Delta m}{\sqrt{3}}. \quad (4.8)$$

Der Vorgang einer Einwaage besteht aus zwei Wägvorgängen (Tara- und Bruttoeinwaage), wodurch die Nichtlinearität zweimal zu berücksichtigen ist. Da diese beiden Ablesungen voneinander unabhängig sind, geht die Standardunsicherheit der Nichtlinearität zweimal ein. Die kombinierte Unsicherheit berechnet sich daher aufgrund unabhängigen Eingangsgrößen wie folgt:

$$u(m_i) = \sqrt{u_W^2(m) + 2 \cdot u_{\text{Nichtlinearität}}^2(m)} = \sqrt{u_W^2(m) + 2 \cdot \left(\frac{\Delta m}{\sqrt{3}}\right)^2}. \quad (4.9)$$

Will man die Unsicherheit der Nichtlinearität nach Typ A bestimmen, so ist die maximale Differenz aller ermittelten Messwerte, das Intervall  $2 \cdot \Delta m$ , zu bestimmen, in dem der wahre, aber unbekannte Wert liegt. Die Unsicherheit berechnet sich dann wie folgt:

$$u_{\text{Nichtlinearität}}(m) = \frac{2 \cdot \Delta m}{\sqrt{12}}. \quad (4.10)$$

Die in dieser Arbeit ausgeführten Wägungen erfolgten mit einer Ablesegenauigkeit von 0,1 mg auf einer Sartorius BP 121 S und mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01 mg auf einer

Mettler AT 261 Delta Range. In Tabelle 4.1 sind die Kenndaten, entnommen aus den Herstellerblättern, sowie die daraus nach Typ B berechneten Unsicherheiten aufgeführt.

Tabelle 4.1: Kenndaten aus den Herstellerangaben für die verwendeten Waagen. Ermittlung der Einwaageunsicherheit nach Typ B.

	Sartorius BP 121 S	Mettler AT 261 Delta Range
Ablesegenauigkeit	0,1 mg	0,01 mg
$u_W(m)$	0,1 mg	Einwaage bis 50 g: 0,015 mg
$\Delta m$	0,2 mg	0,03 mg
$u(m)$ (Gleichung (4.9))	0,2 mg	0,03 mg

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Überprüfungen der Waagen wurde durch den DKD eine Kalibrierung der Sartorius BP 121 S vorgenommen. Hierzu wurden mit einem Eichgewicht von 100 g sechs Messungen ausgeführt, deren Standardabweichung zu 0,05 mg bestimmt wurde. Die maximale Abweichung von 0,1 mg ( $2 \cdot \Delta m$ ) bei der Überprüfung der Nichtlinearität wurde bei vier Tara-Einwaagen (0 g, 30 g, 60 g und 100 g) mit einem Eichgewicht von 20 g bestimmt. Aus diesen beiden Angaben wurde nach Typ A die Standardunsicherheit einer Einwaage nach Gleichung (4.9) berechnet, wobei die Unsicherheit der Nichtlinearität der Waage nach Gleichung (4.10) ermittelt wurde. Daraus ergab sich eine Standardunsicherheit von 0,08 mg. Diese liegt deutlich unterhalb der aus den Herstellerdaten ermittelten. Der Freiheitsgrad einer Wägung wird zu 1000 gesetzt.

#### 4.2.5 Reinheitsgrad, Reinheitsfaktor

Die Standardunsicherheit des Reinheitsgrades bzw. des Reinheitsfaktors eines Standards kann bei einem ZRM direkt aus dem Zertifizierungsschein nach Typ B übernommen werden. Ist dabei ein Erweiterungsfaktor angegeben worden, so ist die angegebene Unsicherheit durch diesen Faktor zu dividieren. Liegt bei Einsatz eines anderen Standards keine Angabe über die Unsicherheit des Reinheitsgrades vor, so ist die Reinheit experimentell zu ermitteln und mit der Unsicherheit des eingesetzten Verfahrens zu belegen.

Zusammengefasst ergeben sich somit die nach Gleichung (4.3) aufgestellten kombinierten Messunsicherheiten für Stoffmengenverhältnis und -anteil zu

$$u_c(y) = y \cdot \sqrt{\left( \frac{u(I_X / I_Y)}{I_X / I_Y} \right)^2}, \quad (4.11)$$

für die Reinheitsanalyse zu

$$u_c(y) = y \cdot \sqrt{\left(\frac{u(I_{Anl}/I_{Std})}{I_{Anl}/I_{Std}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{Anl})}{M_{Anl}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{Std})}{M_{Std}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Anl})}{m_{Anl}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Std})}{m_{Std}}\right)^2 + \left(\frac{u(P_{Std})}{P_{Std}}\right)^2} \quad (4.12)$$

und für die Gehaltsanalyse zu

$$u_c(y) = y \cdot \sqrt{\left(\frac{u(I_{Anl}/I_{Std})}{I_{Anl}/I_{Std}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{Anl})}{M_{Anl}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{Std})}{M_{Std}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Anl})}{m_{Anl}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Std})}{m_{Std}}\right)^2 + \left(\frac{u(f_{Std})}{f_{Std}}\right)^2} \quad (4.13)$$

### 4.3 Ermittlung der Messunsicherheit von quantitativen NMR-Analyseverfahren mittels Referenzwerten

Die im Kapitel 4.2 beschriebene Messunsicherheit für quantitative NMR-Messungen berücksichtigt nur zufällige Abweichungen der Eingangsgrößen im Unsicherheitsbudget. Um die Messunsicherheit eines Analyseverfahrens vollständig zu beschreiben, ist zusätzlich die Ermittlung systematischer Abweichungen nötig. Hierzu wird ein Soll-Ist-Vergleich des Mittelwertes des Analyseergebnisses  $\bar{x}_{Anl} \pm u_c(\bar{x}_{Anl})$  mit einem zugehörigen Referenzwert  $x_{Ref} \pm u(x_{Ref})$  durchgeführt. Die Differenz

$$\Delta_{Anl} = \bar{x}_{Anl} - x_{Ref} \quad (4.14)$$

beschreibt die systematische Abweichung des Analysenwertes vom Referenzwert, deren Standardunsicherheit  $u(\Delta_{Anl})$  wie folgt berechnet wird:

$$u(\Delta_{Anl}) = \sqrt{u_c(\bar{x}_{Anl})^2 + u(x_{Ref})^2} \quad (4.15)$$

Über das Ausmaß der systematischen Abweichung gibt das folgende Kriterium Auskunft [7]:

$$|\Delta_{Anl}| \leq 2u(\Delta_{Anl}) \quad (4.16)$$

Bei Nichterfüllung dieser Gleichung liegt eine signifikante systematische Abweichung vor, die entweder zu eliminieren (Analyseverfahren verbessern) oder rechnerisch zu korrigieren ist (Korrekturterm). Kann davon ausgegangen werden, dass diese systematische Abweichung nicht konstant auftritt, so ist sie als Unsicherheitsbeitrag direkt im Unsicherheitsbudget zu berücksichtigen. Allgemein wird bei Erfüllung dieses Kriteriums (Gleichung 4.16) die systematische Abweichung als nicht signifikant eingestuft und daher vernachlässigt. Diese Vorgehensweise hat jedoch zur Folge, dass zwar für  $\Delta_{Anl} \leq u(\Delta_{Anl})$  (Fall 1) der Analysenwert einschließlich der kombinierte Unsicherheit in der erweiterten Messunsicherheit des Verfahrens erfasst wird, bei  $u(\Delta_{Anl}) < \Delta_{Anl} \leq 2u(\Delta_{Anl})$  (Fall 2) jedoch die kombinierte Unsicherheit des Analysenwertes zum Teil außerhalb der Messunsicherheit des Verfahrens liegt (Abbildung 4.2, schwarze Linien).



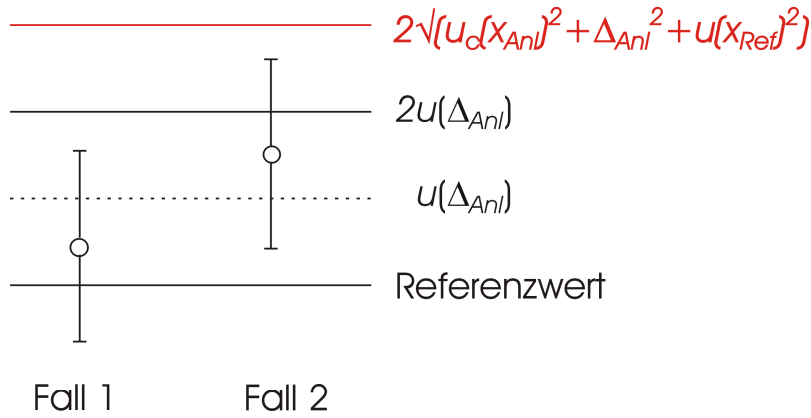


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung bei der Betrachtung der Messunsicherheit eines Analysenverfahrens bei unterschiedlicher Handhabung von systematischen Abweichungen. Schwarz: Geringfügige Abweichungen werden vernachlässigt; Fall 1 wird mit der Messunsicherheit des Verfahrens vollständig beschrieben, nicht aber Fall 2. Rot: Geringfügige Abweichungen werden berücksichtigt; beide Fälle liegen innerhalb der Messunsicherheit des Verfahrens.

In der vorliegenden Arbeit soll die Messunsicherheit eines Analysenverfahrens entsprechend der Anlage 1 zum QMH-I-5 der BAM, dem Konzept zur Ermittlung und Angabe von Messunsicherheiten der Abteilung I [59], berechnet werden. Hiernach werden auch geringfügige Abweichungen, die obiges Kriterium erfüllen (Gleichung 4.16), im Unsicherheitsbudget eingerechnet. Die im Kapitel 4.2 aufgestellten Unsicherheitsbudgets für die vier Anwendungsgebiete (Gleichungen 4.11, 4.12 und 4.13), hier als  $u_c(x_{Anl})$  bezeichnet, müssen zur Betrachtung der Messunsicherheit des Analysenverfahrens um die Beiträge der systematischen Abweichung  $\Delta_{Anl}$  und der Unsicherheit des Referenzwertes  $u(x_{Ref})$  erweitert werden. Man erhält somit für die Messunsicherheit eines Analysenverfahrens die folgende kombinierte Unsicherheit:

$$u_c(y) = \sqrt{u_c(x_{Anl})^2 + \Delta_{Anl}^2 + u(x_{Ref})^2}. \quad (4.17)$$

Hierbei wird auch der Fall 2 der Abbildung 4.2 mit der so berechneten Messunsicherheit des Verfahrens (rote Linie) vollständig miterfasst.

## 5 Stoffmengenverhältnisse und -anteile

Zu den Aufgaben des CCQM gehört es, Messunsicherheiten chemisch-analytischer Messmethoden zu beschreiben und die Richtigkeit zu verbessern. Das Labor I.31 der BAM wurde vom CCQM mit der Organisation von internationalen Ringversuchen zur Ermittlung der Leistungsfähigkeit der quantitative NMR-Spektroskopie beauftragt. Die Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen mit der  $^1\text{H}$ -SP-Technik ist – wie in den Kapiteln 3.2 und 3.5 beschrieben – die einfachste Anwendung der quantitativen NMR-Spektroskopie und eignet sich daher ideal zur Ermittlung der metrologischen Qualität der Methode (Spektrenaufnahme, -prozessierung und -auswertung).

### 5.1 Grundvoraussetzungen zur Bestimmung der Genauigkeit der Methode

Die Bestimmung der Messunsicherheit einer Methode erfordert neben der Evaluierung und Validierung die Durchführung von Ringversuchen zur Ermittlung der Vergleichspräzision. Während die ersten beiden Punkte schon ausführlich bearbeitet wurden [14, 8], sind die bisher in der Literatur in geringer Zahl veröffentlichten Ringversuche entweder nur mit einer kleinen Teilnehmeranzahl [60] oder mit einem spezifizierten Gerät [61] organisiert worden. Es ist jedoch wichtig, eine allgemeingültige Aussage über die Leistungsfähigkeit der NMR-Spektroskopie unabhängig vom Hersteller oder der Magnetfeldstärke zu treffen, die auf einer großen Anzahl von Teilnehmerdaten beruht. Daher wurden parallel zu den internationalen Ringversuchen, an denen sich nur Nationale Metrologieinstitute bzw. von diesen beauftragte Labore beteiligten, entsprechende Ringversuche auf nationaler Ebene mit Teilnehmern aus Industrie, Forschung und Hochschulen ausgerichtet.

#### 5.1.1 Anforderungen an eine ideale Modell-Lösung

Die Messunsicherheit der Methode sollte unter optimalen Bedingungen bestimmt werden. Hierzu gehört die unproblematische Auswertung des  $^1\text{H}$ -Spektrums einer zu analysierenden Modell-Lösung. Dafür wurden folgende Ansprüche an eine ideale Modell-Lösung gestellt:

- Die Substanzen sollten möglichst schmale Singulett-Signale im Spektrum aufweisen.
- Der Abstand zwischen den einzelnen Signalen sollte im Spektrum so groß sein, dass die  $^{13}\text{C}$ -Satelliten der Protonensignale sich nicht überlagern. Somit ist eine problemlose Integration aller Signale sichergestellt, d.h. keine Überlagerung der Signale und der Integrationsbereiche.
- In den jeweils zu integrierenden Bereichen sollten keine signifikanten Fremdsignale (z. B. vom Lösungsmittel) vorliegen.
- Die eingesetzten Substanzen sollten einen Reinheitsgrad  $\geq 99\%$  besitzen.
- Die Modell-Lösung sollte stabil sein.

### 5.1.2 Arbeitsanweisung zur Aufnahme und Auswertung quantitativer Single-Pulse-NMR-Spektren

Die Notwendigkeit einer Arbeitsanweisung für die Aufnahme und Auswertung quantitativer  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektren zum Erhalt von Messergebnissen mit hoher Richtigkeit und Präzision wurde aus den ersten beiden von der BAM organisierten Ringversuchen NMR-1 und CCQM-4 deutlich [62, 63]. Hierbei zeigten die unter Laborroutine aufgenommenen und ausgewerteten Spektren gravierende Abweichungen sowohl zum gravimetrischen Referenzwert (bis 100 % relativ) als auch zwischen den einzelnen Teilnehmern, die auf falsche Parameterwerte, auf unzureichende Spektrenkorrekturen (Phase und Grundlinie) und die Handhabung der Integration zurückzuführen waren. Andererseits wurde bei der Validierung der Methode bei sorgfältiger Arbeitsweise laborintern eine relative Messunsicherheit von unter 1,5 % erreicht [14]. Aufbauend auf dieser Validierung wurde die folgende Arbeitsanweisung zur Aufnahme, Prozessierung und Auswertung quantitativer SP-NMR-Spektren erarbeitet.

Tabelle 5.1: Standardparameter zur Aufnahme quantitativer  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektren.

Parameter	Bruker-Nomenklatur	Wert
90°-Impuls-Stärke	PI1	gerätespezifisch
90°-Impuls-Länge	P1	gerätespezifisch
Spin Rotation		Optional
Messtemperatur	TE	300 K
Anregungsfrequenz	o1	Mitte des Spektrums
Anregungswinkel		30°
Aufnahmeverzögerung	DE	5 $\mu\text{s}$
Aufnahmezeit	AQ	3,41 s
Relaxationsintervall	D1	$\geq (7/3) \times \text{längste } T_1\text{-Zeit}$
Spektralweite	SW	12 ppm
Filterweite	FW	$\geq 14$ ppm
Anzahl der Datenpunkte des FID	TD	32 k
Anzahl der Scans	ns	abhängig vom erreichten S/N
Signal-zu-Rausch-Verhältnis	S/N	$\geq 150$
Line broadening	lb	0,3 Hz
Anzahl der Spektrenpunkte	SI	64 k

Die Aufnahme und Prozessierung der Spektren erfolgt mit den in Tabelle 5.1 aufgeführten validierten Werten für die wichtigsten Parameter. Geräte- und probenspezifische Parametergrößen wie die Impuls-Stärke und -Länge des 90°-Anregungsimpulses, der Receiver Gain (RG) sowie die längste  $T_1$ -Zeit der auszuwertenden Signale zur Setzung des Relaxationsintervalls (D1) sind vor der Messung zu bestimmen. Bei einer guten Auflösung des Spektrums kann es notwendig sein, die Anzahl der Datenpunkte (TD) zu verdoppeln und

damit proportional die Aufnahmezeit (AQ) zu erhöhen, um ein zu frühes Abschneiden des FIDs zu vermeiden.

Nach der Fourier-Transformation mit vorheriger exponentieller Multiplikation des FIDs sind Phasen und Grundlinie im Spektrum sorgfältig zu korrigieren. Die Integrationsgrenzen sind in Abhängigkeit von den Halbwertsbreiten der auszuwertenden Signale mit einem konstanten Integrationsfaktor multipliziert zu setzen. Dabei ist die Erfassung der  $^{13}\text{C}$ -Satelliten aus der  $^1\text{J}(\text{CH})$ -Kopplung bei allen Signalen gleich zu handhaben. Die partielle Mitintegration dieser  $^{13}\text{C}$ -Satelliten ist bei der Auswertung zu berücksichtigen (Korrektur der Intensität entsprechend je  $^{13}\text{C}$ -Satellit um 0,55 %). Die  $^{13}\text{C}$ -Satelliten aus den  $^2\text{J}(\text{CH})$ -Kopplungen liegen bei einem Integrationsfaktor von 64 bei Halbwertsbreiten von generell  $> 0,6$  Hz immer im Integrationsbereich. Anschließend sind die gesetzten Integrale einzeln auf maximale Darstellung auf dem Monitor zu vergrößern und gegebenenfalls mit BIAS und SLOPE (Bruker-Nomenklatur) auf geraden Integralzuganlauf und -auslauf zu korrigieren. Die Berechnung von Stoffmengenverhältnissen aus den Intensitätswerten des Spektrums erfolgt nach Gleichung (3.11), die von Stoffmengenanteilen nach Gleichung (3.12).

## 5.2 Nationaler und internationaler Ringversuch (NMR-2, CCQM-P3)

Ziel des zweiten vom CCQM beauftragten internationalen Ringversuchs CCQM-P3 sowie des parallel verlaufenden nationalen Ringversuches NMR-2 war die Bestimmung der Messunsicherheit von quantitativen Aussagen der  $^1\text{H}$ -NMR an einer Modell-Lösung, deren Spektren nach einer Arbeitsanweisung aufgenommen und ausgewertet werden sollten.

Die Darstellung der Ergebnisse der beiden Ringversuche erfolgte in Diagrammen, die tabellarische Wiedergabe der Teilnehmerwerte befindet sich im Anhang (Kapitel 11.1). Die erweiterte Unsicherheit für ein 95%iges Konfidenzintervall wurde aus den Angaben der Teilnehmer nach den Gleichungen (4.1) und (4.4) mit  $n = 5$  und  $k = 2,8$  berechnet. Zusätzlich zur Angabe der Absolutwerte sind die Abweichungen der Messwerte von den gravimetrischen Referenzwerten entsprechend Gleichung 4.14 und deren erweiterte Unsicherheiten berechnet worden und zur besseren Ablesbarkeit der Richtigkeit der Teilnehmerdaten als zweite Ordinate in den Diagrammen mit dargestellt. Ein Erwartungsbereich von  $\pm 2$  % relativer Abweichung sowie der gravimetrische Referenzwert werden durch Hilfslinien in den Diagrammen wiedergegeben.

### 5.2.1 Probenzusammensetzung

Die Einhaltung der im Kapitel 5.1.1 aufgeführten Forderungen bei der Auswahl der Substanzen und des Lösungsmittels erwies sich als schwierig. Viele der mit dem geforderten Reinheitsgrad von  $\geq 99$  % infrage kommenden Substanzen waren entweder nicht stabil, zeigten keine Singulets oder überlagerten sich mit anderen Signalen im Spektrum. Ferner enthalten

viele Lösungsmittel mit hohem Deuterierungsgrad ( $> 99,5\%$ ) intensive Fremdsignale, die im Gegensatz zur Strukturanalytik bei quantitative Analysen stören (Abbildung 5.1).

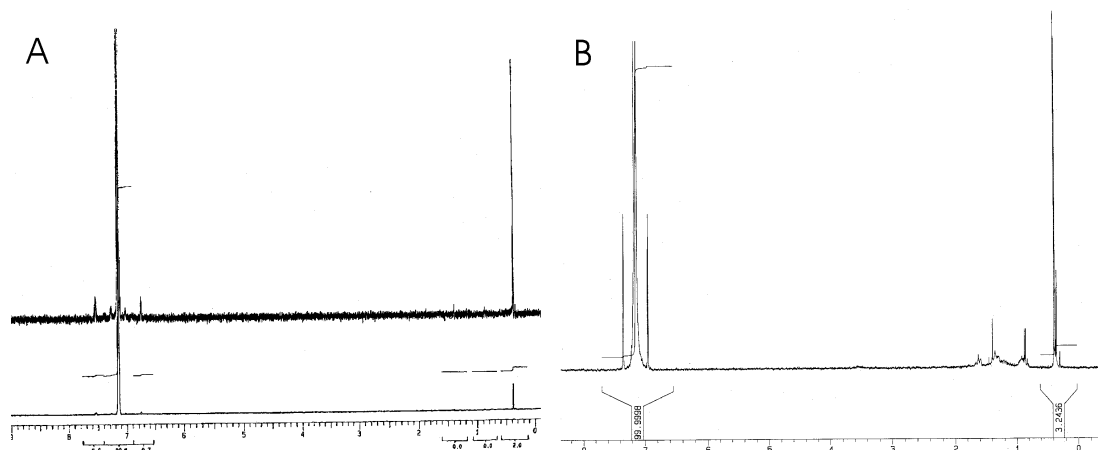


Abbildung 5.1: Reinheitsspektren von Benzol-D6 (99,5 % Deuterierungsgrad); A: Kontrollspektrum der Firma Merck KG (200 MHz); B: Spektrum am DMX 400 mit 128 Scans.

Deuteriertes Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) reagierte mehrfach mit den ausgewählten Substanzen (speziell mit substituierten Benzol-Systemen). Nach wenigen Tagen konnten, wie in der Abbildung 5.2 erkennbar, Fremdsignale mit einer relativen Intensität von ca. 0,5 % und mehr nachgewiesen werden.

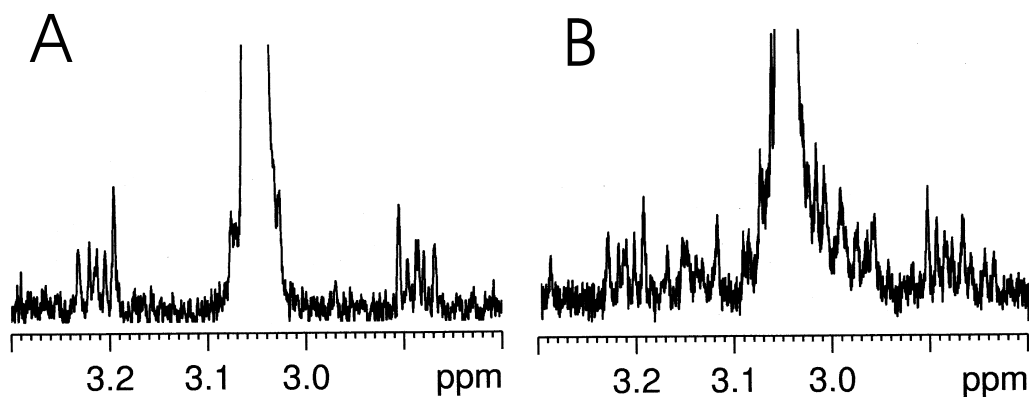


Abbildung 5.2: Reaktion von [2,2]-Paracyclophan mit  $\text{CDCl}_3$ . A: Ausgangsspektrum, B: drei Tage später.

Indessen erwies sich deuteriertes Benzol ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) als ein chemisch inertes und somit geeignetes Lösungsmittel. Somit wurden aus den fünf in Tabelle 5.2 aufgeführten, in  $\text{C}_6\text{D}_6$  gelösten kommerziellen Produkten mit einer vom Hersteller angegebenen Reinheit von jeweils  $> 99\%$  (Ausnahme:  $\text{D}_4 > 98\%$ ) Modell-Lösungen für die beiden Ringversuche hergestellt.

Tabelle 5.2: Komponenten der Ringlösungen CCQM-P3 und NMR-2.

Komponente		Summenformel	Molmasse in g mol <sup>-1</sup>	Monitor Signal in ppm
Ethyl-4-toluolsulfonat	ETS	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> S	200,2	CH <sub>3</sub> (t) 0,77
[2,2]-Paracyclophan	Par	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub>	208,3	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (s) 2,83
1,2,4,5-Tetramethylbenzol	Dur	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub>	134,2	(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (s) 2,08
Cyclododekan	Cy <sub>12</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168,3	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> (s) 1,34
Oktamethylcyclotetrasiloxan	D <sub>4</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>4</sub>	296,6	(CH <sub>3</sub> ) <sub>8</sub> (s) 0,21

Lediglich beim ETS konnte der angegebene Reinheitsgrad nicht bestätigt werden. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum enthielt intensive Signale der o-isomeren Verbindung, deren relativer Stoffmengenanteil, wie in Abbildung 5.3 dargestellt, zu 2 % bestimmt wurde. Die Integration des ETS-Signals inklusive der o-isomeren Verbindung gibt die der Einwaage entsprechende Intensität richtig wieder.

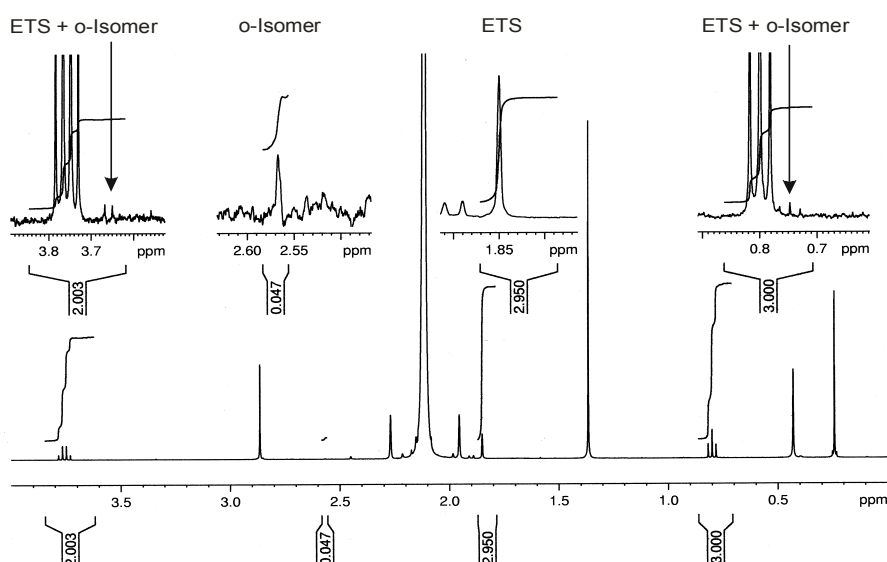


Abbildung 5.3: Bestimmung des Stoffmengenanteils der o-isomeren ETS-Komponente in der NMR-2 Ringlösung.

Die molare Zusammensetzung der für den internationalen Ringversuch zu analysierenden Modell-Lösung wurde vom CCQM vorgegeben. Diese sollte aus einer Haupt- und vier Nebenkomponten mit je einem relativen Stoffmengenanteil im Bereich von 1 % bis 2 % bestehen. Für den nationalen Ringversuch NMR-2 wurde der Stoffmengenanteil der Nebenkomponten auf jeweils ca. 1 % zur Hauptkomponente verringert. Die daraus resultierenden Einwaagen und molaren Zusammensetzungen der beiden Ringlösungen CCQM-P3 und NMR-2 sind den Tabellen 5.3 und 5.4 zu entnehmen.

Tabelle 5.3: Einwaagen und molare Zusammensetzungen der Ringlösung CCQM-P3 (gelöst in 100 ml Benzol-d<sub>6</sub>). Gravimetrische Referenzwerte für die Bestimmung der Stoffmengenverhältnisse und -anteile.

	$m_i$  in mg	$n_i$  in mmol	$\frac{n_i}{n_{D_4}}$  in mol mol <sup>-1</sup>	$\frac{n_i}{\sum_{j=1}^5 n_j} * 100\%$  in mol mol <sup>-1</sup> %
ETS	64,38 ± 0,03	0,3215 ± 0,0001	1,1486 ± 0,0007	1,8385 ± 0,0009
Par	45,64 ± 0,03	0,2191 ± 0,0001	0,7828 ± 0,0006	1,2530 ± 0,0008
Dur	2211,41 ± 0,03	16,4758 ± 0,0002	58,863 ± 0,021	94,221 ± 0,002
Cy <sub>12</sub>	31,99 ± 0,03	0,1901 ± 0,0002	0,6790 ± 0,0007	1,0868 ± 0,0010
D <sub>4</sub>	83,03 ± 0,03	0,2799 ± 0,0001	1	1,6007 ± 0,0006

Tabelle 5.4: Einwaagen und molare Zusammensetzungen der Ringlösung NMR-2 (gelöst in 250 ml Benzol-d<sub>6</sub>). Gravimetrische Referenzwerte für die Bestimmung der Stoffmengenverhältnisse und -anteile.

	$m_i$  in mg	$n_i$  in mmol	$\frac{n_i}{n_{D_4}}$  in mol mol <sup>-1</sup>	$\frac{n_i}{\sum_{j=1}^5 n_j} * 100\%$  in mol mol <sup>-1</sup> %
ETS	41,67 ± 0,03	0,2081 ± 0,0001	2,697 ± 0,004	1,0244 ± 0,0007
Par	29,72 ± 0,03	0,1427 ± 0,0001	1,849 ± 0,003	0,7024 ± 0,0007
Dur	2647,28 ± 0,03	19,7231 ± 0,0002	255,6 ± 0,3	97,100 ± 0,002
Cy <sub>12</sub>	27,11 ± 0,03	0,1611 ± 0,0002	2,087 ± 0,004	0,7929 ± 0,0009
D <sub>4</sub>	22,89 ± 0,03	0,0772 ± 0,0001	1	0,3799 ± 0,0005

Die Abbildung 5.4 gibt das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der auszuwertenden Signale im aliphatischen Bereich der beiden Ringlösungen sowie deren Zuordnung zu den Substanzen wieder. Um die Stabilität der Lösungen zu kontrollieren, wurden vor Versenden der Probe – und bis zu einem Jahr später – mehrfach Spektren aufgenommen sowie die Lösungen einer thermischen Belastung (drei Wochen bei 44°C) ausgesetzt. Die Auswertungen der Spektren bestätigten die Stabilität der Lösungen.

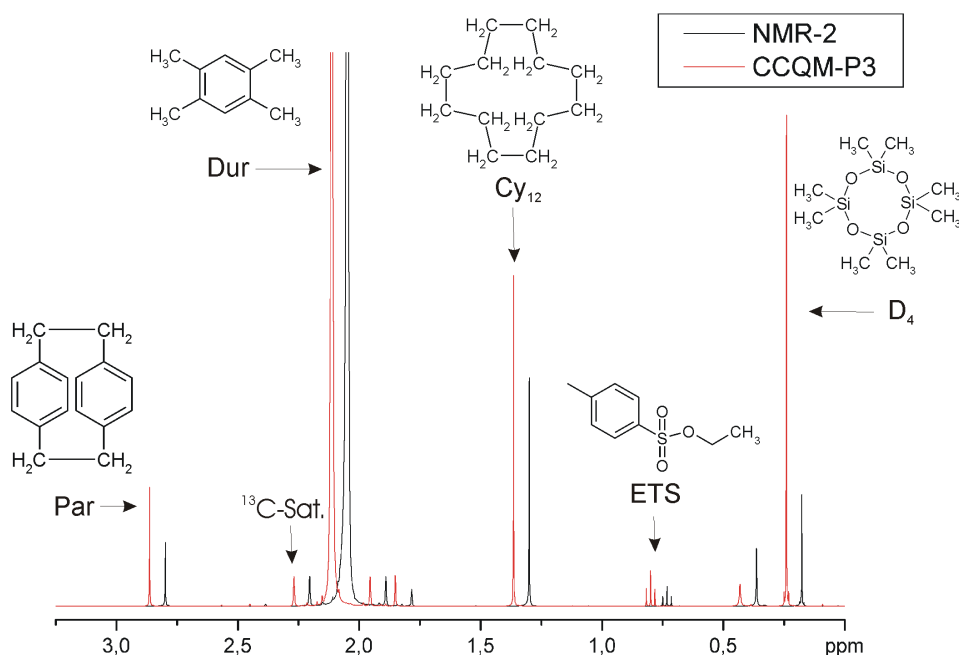


Abbildung 5.4:  $^1\text{H}$ -Spektrum der auszuwertenden aliphatischen Signale der beiden Ringlösungen für CCQM-P3 (rot) und NMR-2 (schwarz). Zur besseren Darstellung wurde das schwarze Spektrum um 0,06 ppm Richtung Hochfeld verschoben.

## 5.2.2 Vorschriften zur Messung und Auswertung

Die Teilnehmer der Ringversuche erhielten je eine Ampulle mit 1,2 ml Ringlösung (ausreichend zur Befüllung eines 5 mm NMR-Probenröhrchens), die Arbeitsanweisung sowie ein Mess- und Ergebnisprotokoll. Zur Bestimmung der Vergleichspräzision war die Probe mit den validierten Standardparametern (Tabelle 5.1) an fünf verschiedenen Tagen je einmal zu messen. Das Relaxationsintervall ( $D_1$ ) war entsprechend der längsten  $T_1$ -Zeit aller auszuwertenden Signalen – hier 4,0 s für ETS – auf 15 s einzustellen. Die Akkumulation von 128 Scans sollte generell bei allen NMR-Spektrometern zu einem ausreichenden S/N ( $> 150$ ) führen. Die Auswertung der Spektren hatte nach dem im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Verfahren zu erfolgen, wobei bei der Setzung der Integrale ein Integrationsfaktor von 64 anzuwenden war, um mindestens 99 % der Gesamtintensität jedes Signals mit dem Integral zu erfassen. Alle verwendeten Parameter sowie die chemischen Verschiebungen, Halbwertsbreiten, Integrationsbereiche und die Intensitäten eines jeden Signals waren ins Messprotokoll aufzunehmen. Ferner sollten Abweichungen von der Arbeitsanweisung – auch gerätespezifische (z.B. Parameter für den  $90^\circ$ -Impuls) – im Messprotokoll dokumentiert werden. Im Ergebnisbericht waren die Stoffmengenverhältnisse bezogen auf  $D_4$  – nach Gleichung 3.11 berechnet – sowie die Schätzwerte und deren Standardabweichungen anzugeben. Die Analyse sollte in zwei Monaten durchgeführt und anschließend das Mess- und Ergebnisprotokoll inklusive eines Spektrums zurückgesendet werden.



### 5.2.3 Auswertung des internationalen Ringversuchs CCQM-P3

Tabelle 5.5: Teilnehmer am internationalen Ringversuch CCQM-P3.

Nationales Metrologieinstitut	Abkürzung	Staat
National Analytical Reference Laboratory	NARL	Australien
National Research Council of Canada	NRC	Kanada
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung	BAM	Deutschland
National Office of Measures	OMH	Ungarn
Korea Research Institute of Standards and Science	KRISS	Korea
National Metrology Institute of Japan	NIMC	Japan
Nederlands Meetinstituut	NMI	Niederlande
D.I. Mendeleyev Institute for Metrology	VNIIM	Russland
Slovak Institute of Metrology	SMU	Slowakei
Eidgenössische Materialprüfungs- und Forschungsanstalt	EMPA	Schweiz

Zehn Nationale Metrologieinstitute – in Tabelle 5.5 aufgelistet – nahmen am internationalen Ringversuch CCQM-P3 teil. Dabei lieferte die BAM zwei voneinander unabhängige Messergebnisse ab, so dass insgesamt elf Teilnehmerergebnisse vorlagen. Die eingesandten Analysenergebnisse der Teilnehmer sind der Tabelle 11.1 zu entnehmen und wurden in der Abbildung 5.5 als Diagramme graphisch dargestellt.

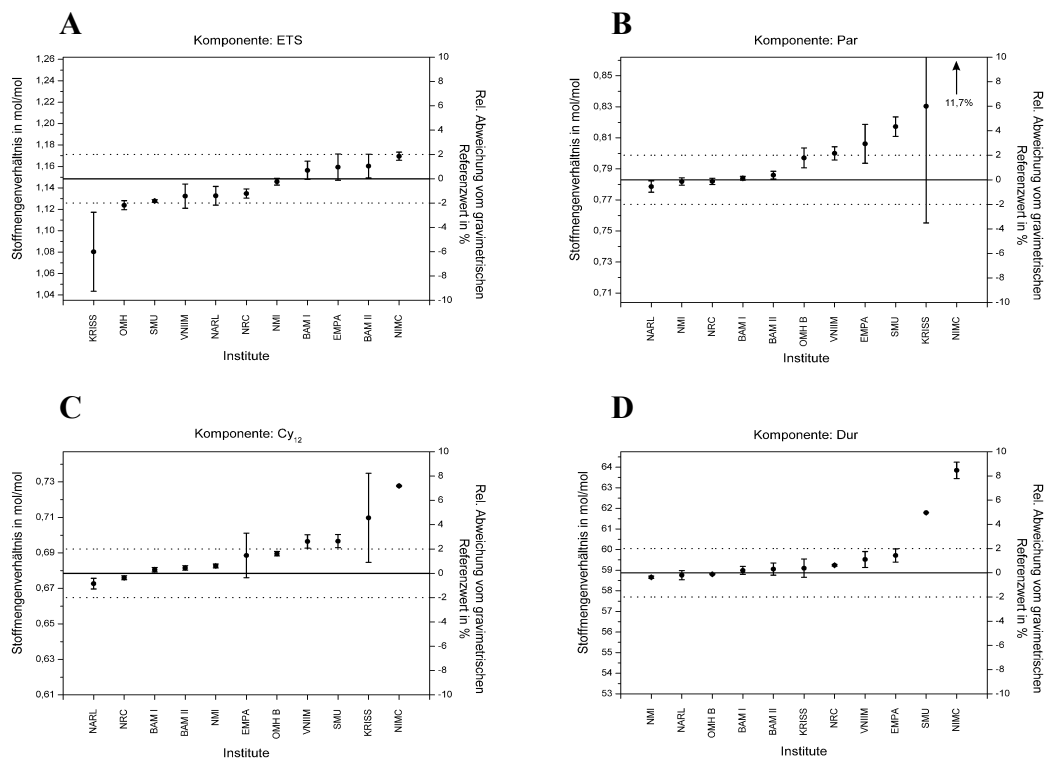


Abbildung 5.5: Ergebnisse des internationalen Ringversuchs CCQM-P3 bei der Auswertung als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf D<sub>4</sub> (A: ETS, B: Par, C: Cy<sub>12</sub>, D: Dur).

Aus diesen ist erkennbar, dass die Analysenergebnisse von acht der elf Teilnehmern generell eine Richtigkeit zu je besser als 98 % aufweisen. Dagegen weichen die Ergebnisse der Institute NIMC, KRISS und SMU allgemein um mehr als zwei Prozent von den Referenzwerten ab. Zudem zeigen die Analysenergebnisse des Instituts KRISS eine geringe Präzision.

Um die Messunsicherheit der Methode zu bestimmen, wurden die Teilnehmerergebnisse jeder Komponente gemittelt, die Abweichungen zu den gravimetrischen Referenzwerten und deren Unsicherheiten entsprechend den Gleichungen 4.14 und 4.15 berechnet und in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

Tabelle 5.6: Fehleranalyse der Ergebnisse des internationalen Ringversuchs CCQM-P3 (Stoffmengenverhältnisse). Auftragung der Mittelwerte und deren Abweichungen von den gravimetrischen Referenzwerten sowie deren Unsicherheiten. Entscheidung über signifikante Abweichungen nach Gleichung 4.16.

Komponente	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	Signifikante Abweichung?
ETS	1,139	0,008	0,010	0,015	nein
Par	0,804	0,009	0,021	0,017	ja
Dur	59,8	0,5	0,9	1,0	nein
Cy <sub>12</sub>	0,692	0,005	0,013	0,010	ja

Gemäß der Gleichung 4.16 stellten sich bei den beiden Komponenten Par und Cy<sub>12</sub> die Abweichungen der gemittelten Analysenergebnisse zu den gravimetrischen Referenzwerten als signifikant heraus. Eine Analyse der hierfür verantwortlichen Einflussgrößen war daher notwendig und wird im Kapitel 5.3 beschrieben. Die relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ,  $p = 95 \%$ ) der Methode wurde entsprechend Gleichung 4.17 beim ETS zu 2,2 %, beim Dur und Cy<sub>12</sub> zu 4 % und beim Par zu 6 % bestimmt.

Aus den Intensitätswerten der Einzelmessungen wurden analog zum CCQM-4 nach Gleichung (3.12) die Stoffmengenanteile berechnet (Tabelle 11.2). Die graphische Darstellung dieser Werte zeigt in Abbildung 5.6 ein ähnliches Bild wie die Darstellung der Stoffmengenverhältnisse in Abbildung 5.5. Auch hier weichen allgemein die Messergebnisse der Institute KRISS, NIMC und SMU um mehr als 2 % von den gravimetrischen Referenzwerten ab. Beim Dur hingegen liegen die Analysenwerte aller Teilnehmern innerhalb eines Bereiches von  $\pm 1 \%$  relativer Abweichung zum Referenzwert, was jedoch auf den hohen Stoffmengenanteil von 94,2% dieser Komponente zurückzuführen war.

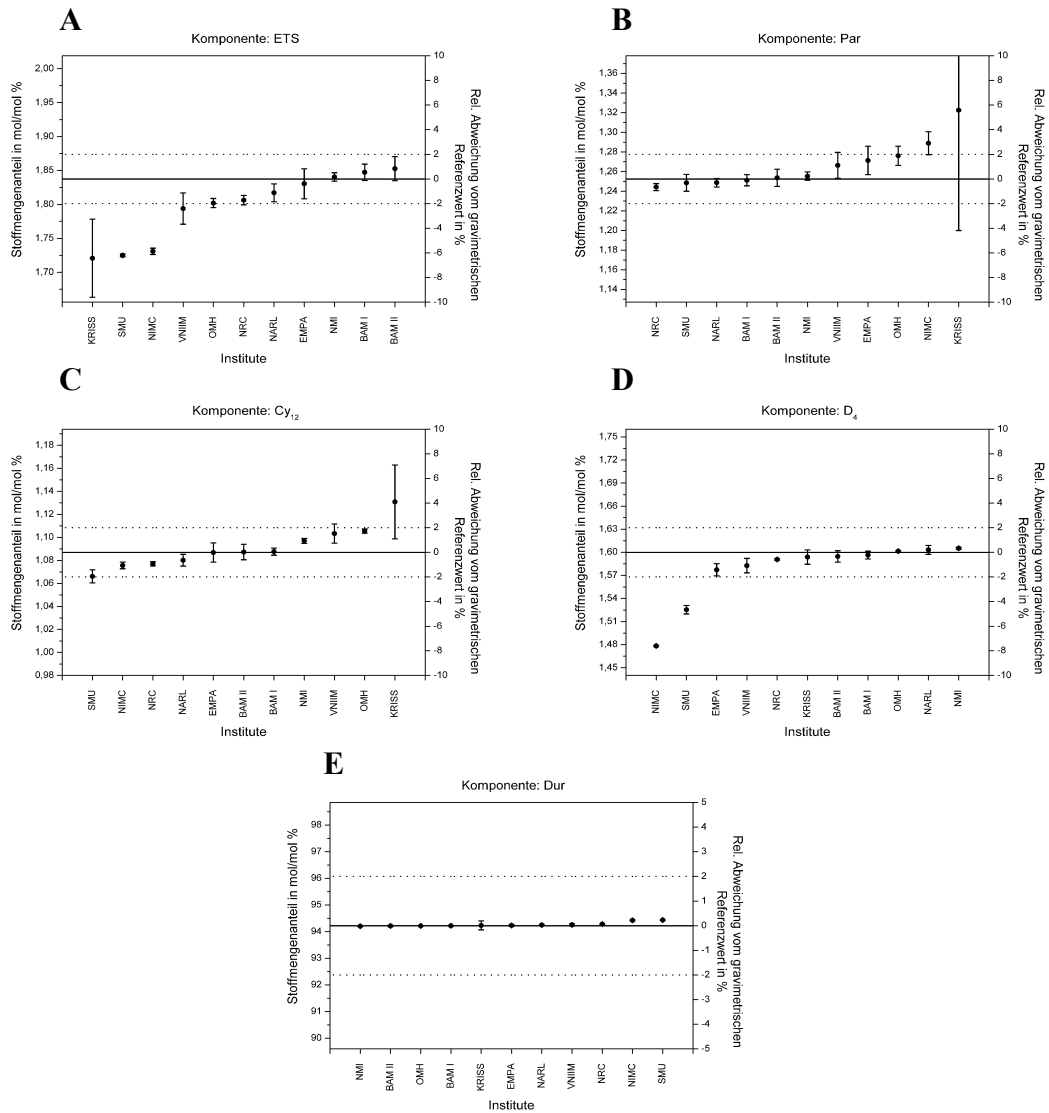


Abbildung 5.6: Ergebnisse des internationalen Ringversuchs CCQM-P3 bei der Auswertung als Stoffmengenanteile (A: ETS, B: Par, C: Cy<sub>12</sub>, D: D<sub>4</sub>, E: Dur).

Die Mittlung der Teilnehmerergebnisse zeigte bei den Komponenten Par, Dur, Cy<sub>12</sub> und D<sub>4</sub> geringfügige Abweichungen der Mittelwerte von den gravimetrischen Referenzwerten, (Tabelle 5.7). Lediglich die Komponente ETS wies hier eine signifikante Abweichung auf. Anhand dieses Ringversuches konnte die relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) der Methode zur Bestimmung von Stoffmengenanteilen für die Hauptkomponente Dur zu unter 0,2% und für die Nebenkomponten für Cy<sub>12</sub> zu 1,2%, Par zu 2,5%, für D<sub>4</sub> zu 3,3% und für ETS zu 5% berechnet werden.

Tabelle 5.7: Fehleranalyse der Ergebnisse des internationalen Ringversuchs CCQM-P3 (Stoffmengenanteile). Auftragung der Mittelwerte und deren Abweichungen von den gravimetrischen Referenzwerten sowie deren Unsicherheiten. Entscheidung über signifikante Abweichungen nach Gleichung 4.16.

Komponente	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	Signifikante Abweichung?
ETS	1,797	0,015	0,041	0,03	ja
Par	1,267	0,007	0,014	0,014	nein
Dur	94,27	0,03	0,05	0,6	nein
Cy <sub>12</sub>	1,091	0,005	0,004	0,010	nein
D <sub>4</sub>	1,578	0,012	0,023	0,024	nein

Zusammenfassend kann aus dem Vergleich der Ergebnisse dieses Ringversuches mit denen des vorangegangenen (CCQM-4) generell eine Verbesserung der Messunsicherheit der Methode durch den Einsatz einer Arbeitsanweisung festgestellt werden. Die Fehleranalyse der gemittelten Analysenergebnisse der Teilnehmer bezogen auf die gravimetrischen Referenzwerte ergab bei beiden Auswertungsarten erhebliche systematische Abweichungen. Zur Verbesserung der Messunsicherheit sind daher weitere Einflussgrößen zu ermitteln. Dieses wird im Kapitel 5.3 behandelt.

#### 5.2.4 Auswertung des nationalen Ringversuchs NMR-2

Die Auswertung des nationalen Ringversuches NMR-2 erfolgte analog zu der des CCQM-P3, jedoch unter anonymer Darstellung der Ergebnisse. Von den insgesamt 39 Analysenergebnissen der 33 teilnehmenden Laboratorien (Teilnehmerliste in Tabelle 11.7) wurden 38 in die Auswertung mit einbezogen, da aufgrund eines offensichtlichen Fehlers (ungeeigneter Messkopf) die Werte eines Teilnehmers – mit seinem Einverständnis – nicht berücksichtigt werden konnten. Die BAM gab zwei von einander unabhängige Analysenergebnisse mit den Labor-Identifizierungsnummern 12 und 14 ab. Am Ringversuch waren Teilnehmer mit NMR-Spektrometern der drei Herstellerfirmen Bruker, Varian und Jeol vertreten, wobei die Vielfalt der eingesetzten Gerätetypen von 4,7 T (200 MHz) bis 14,1 T (600 MHz) reichte. Hierbei handelte es sich sowohl um mit Analog- als auch mit Digital-Filter (mit und ohne Oversampling-Technik) ausgestattete NMR-Spektrometer.

Die zugesandten Schätzwerte und deren erweiterte Messunsicherheiten für die Stoffmengenverhältnisse (bezogen auf D<sub>4</sub>) sind in Tabelle 11.3 aufgelistet.

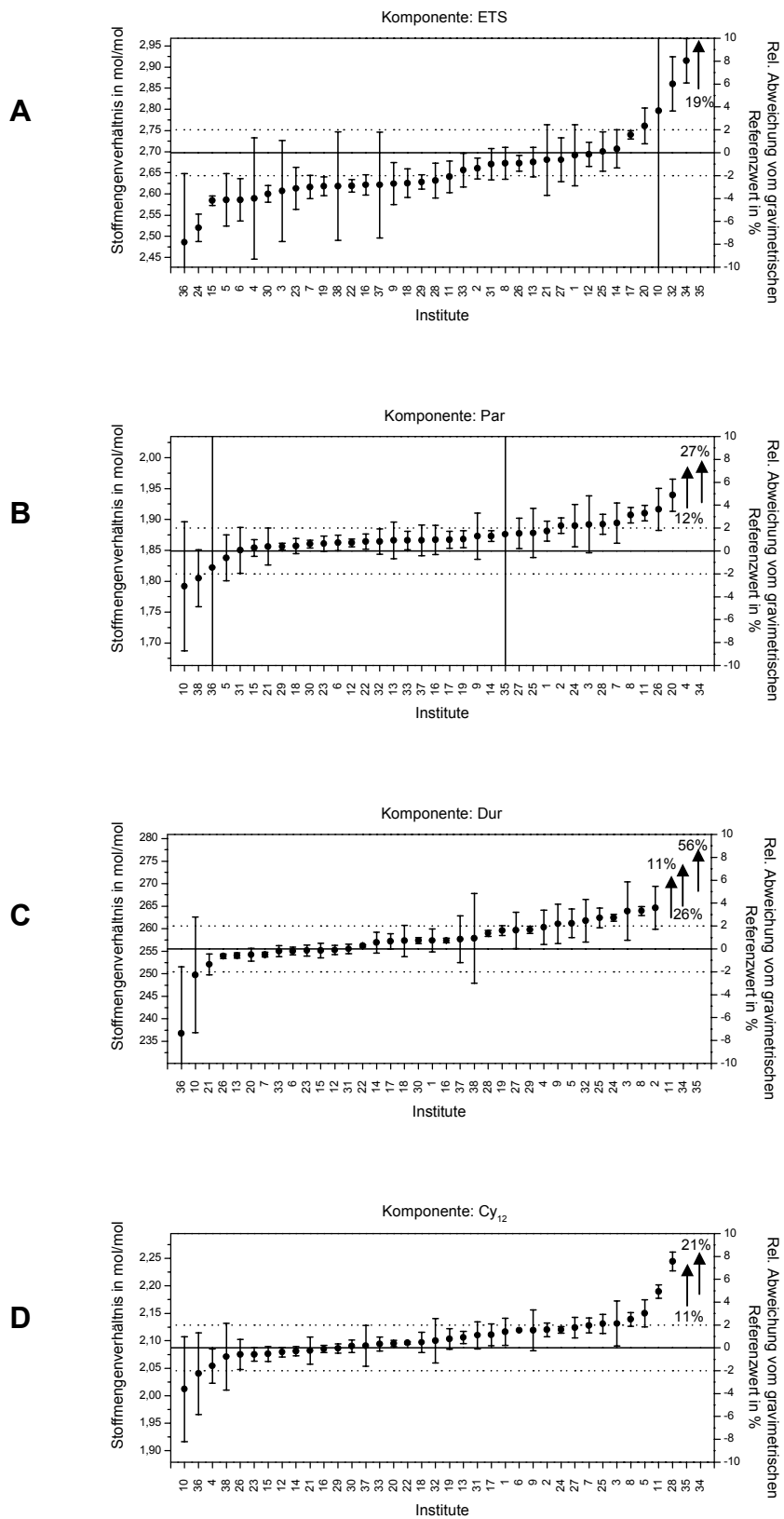


Abbildung 5.7: Ergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 bei der Auswertung als Stoffmengenverhältnis bezogen auf D<sub>4</sub> (A: ETS, B: Par, C: Dur, D: Cy<sub>12</sub>).

Aus der graphischen Darstellung der Teilnehmerdaten in der Abbildung 5.7 ist zu erkennen, dass die Stoffmengenverhältnisse der drei Komponenten Par, Dur und  $\text{Cy}_{12}$  von den meisten Teilnehmer mit einer Richtigkeit von besser als 98 % bestimmt wurden. Nur wenige Labore weichen mit ihren Messwerten um mehr als  $\pm 2$  % relativ von den gravimetrischen Referenzwerten ab. Eine systematische Entwicklung zu positiven Abweichungen ist indessen offensichtlich. Andererseits scheint beim ETS ein Trend von zu kleinen Werten vorzuliegen. Die meisten Messwerte befinden sich hierbei innerhalb eines Bereiches von  $-5$  % bis  $+1$  % relativer Abweichung zum Referenzwert. Auffallend sind die Ergebnisse der Institute 10, 34, 35 und 36, die generell neben einer geringen Präzision (große Unsicherheitsbalken) auch die größten Abweichungen ihrer Ergebnisse von den gravimetrischen Referenzwerten aufweisen.

Die Fehler-Analyse der gemittelten Teilnehmerwerte bezüglich der gravimetrischen Referenzwerte zeigte beim Par eine erhebliche Abweichung, während die Abweichungen der anderen drei Komponenten geringfügig sind (Tabelle 5.8).

Tabelle 5.8: Fehleranalyse der Ergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 (Stoffmengenverhältnisse). Auftragung der Mittelwerte und deren Abweichungen von den gravimetrischen Referenzwerten sowie deren Unsicherheiten. Entscheidung über signifikante Abweichungen nach Gleichung 4.16.

Komponente	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	Signifikante Abweichung?
ETS	2,670	0,020	0,027	0,041	nein
Par	1,887	0,014	0,038	0,029	ja
Dur	263,4	4,1	7,8	8,2	nein
$\text{Cy}_{12}$	2,120	0,014	0,013	0,029	nein

Aus den Ringversuchsergebnissen wurde die relative Messunsicherheit der Methode ( $k = 2$ ,  $p = 95$  %) für ETS zu 2,5 %, für Par zu 5 %, für Dur zu 7 % und für  $\text{Cy}_{12}$  zu 1,9 % bestimmt.

Analog zum Ringversuch CCQM-P3 wurden aus den Intensitätswerten der Einzelmessungen die relativen Stoffmengenanteile nach Gleichung 3.12 berechnet (Tabelle 11.4). Die graphische Darstellung der Stoffmengenanteile in der Abbildung 5.8 zeigt, dass bei der Komponente Dur die Analysenwerte aller Teilnehmern um weniger als 1 % vom Referenzwert abweichen und bei den beiden Komponenten Par und  $\text{Cy}_{12}$  die Abweichungen der Analysenergebnissen vieler Teilnehmer weniger als 2 % betragen.

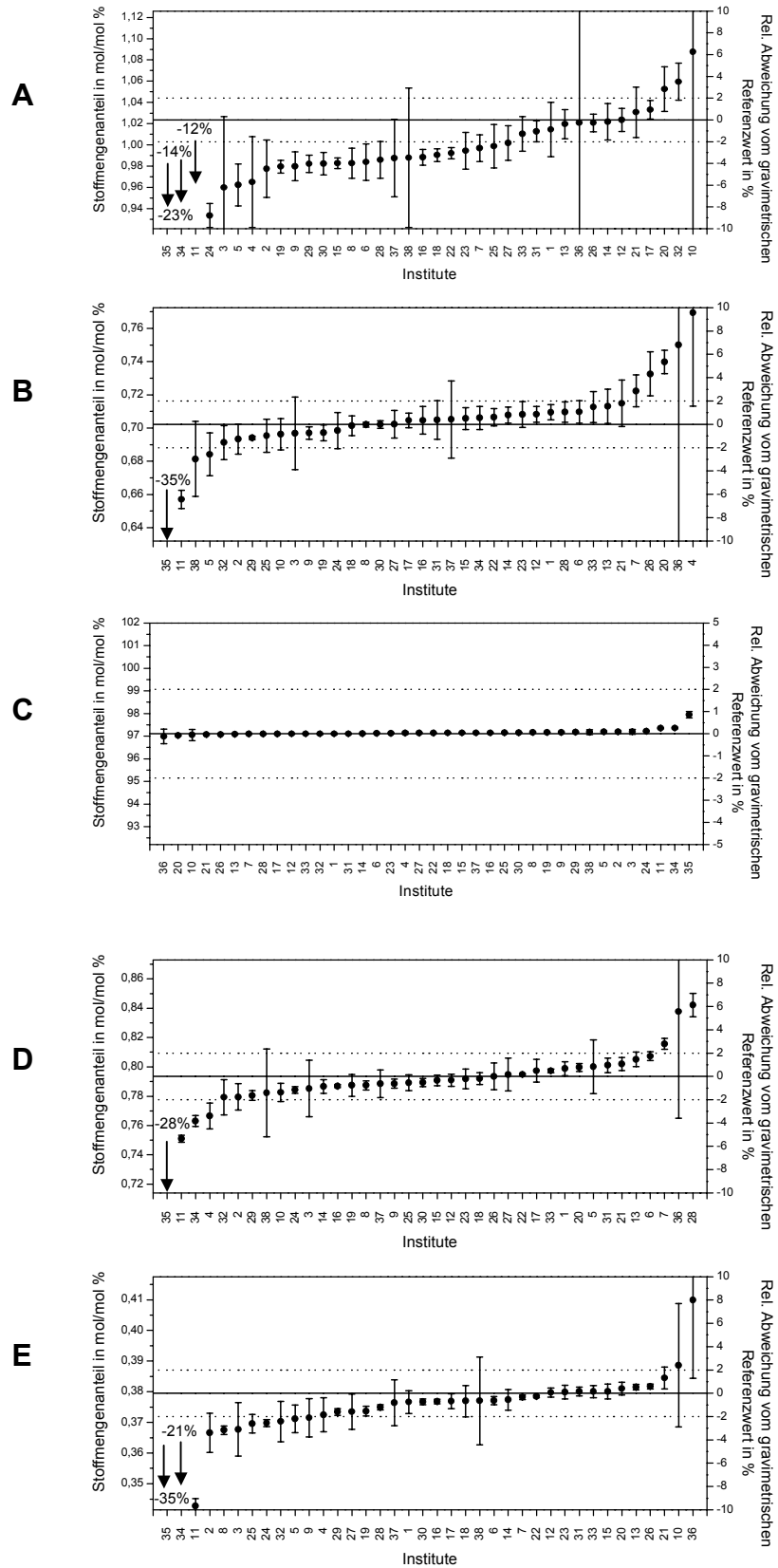


Abbildung 5.8: Ergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 bei der Auswertung als Stoffmengenanteile (A: ETS, B: Par, C: Dur, D: Cy<sub>12</sub>, E: D<sub>4</sub>).

Hingegen wurden bei der Komponente  $D_4$  von elf und beim ETS von 24 Laboratorien signifikant zu geringe Stoffmengenanteile bestimmt. Dieses spiegelt sich beim Soll-Ist-Vergleich der gemittelten Teilnehmerergebnisse mit den gravimetrischen Referenzwerten wider. Während die Abweichungen der gemittelten Teilnehmerergebnisse von den Komponenten Par, Dur und  $Cy_{12}$  sich als geringfügig herausstellten, sind die der beiden Komponenten ETS und  $D_4$  signifikant (Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9: Fehleranalyse der Ergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 (Stoffmengenanteile). Auftragung der Mittelwerte und deren Abweichungen von den gravimetrischen Referenzwerten sowie deren Unsicherheiten. Entscheidung über signifikante Abweichungen nach Gleichung 4.16.

Komponente	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	Signifikante Abweichung?
ETS	0,989	0,008	0,035	0,016	ja
Par	0,700	0,007	0,002	0,014	nein
Dur	97,15	0,03	0,05	0,06	nein
$Cy_{12}$	0,786	0,006	0,007	0,012	nein
$D_4$	0,371	0,004	0,009	0,008	ja

Die relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) der Methode wurde hier für die Hauptkomponente Dur zu 0,12 % und für die Nebenkomponten ETS zu 7 %, für Par zu 2,1 %, für  $Cy_{12}$  zu 2,4 % und für  $D_4$  zu 5 % ermittelt. Nichtsdestoweniger ist gegenüber dem ersten nationalen Ringversuch NMR-1 trotz eines größeren Verhältnisses zwischen der Haupt- und den Nebenkomponten eine Verbesserung der Messunsicherheit der Methode erzielt worden, wie in der Abbildung 5.9 zu ersehen.

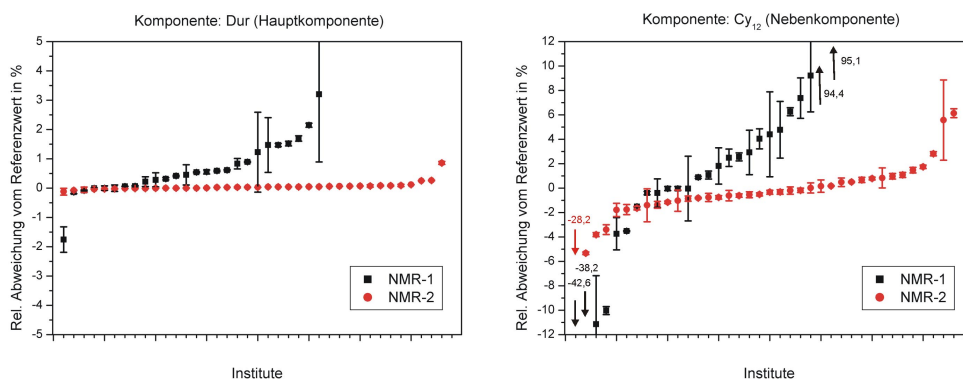


Abbildung 5.9: Verbesserung der Messunsicherheit der Methode: Vergleich zwischen den beiden nationalen Ringversuchen NMR-1 und NMR-2.



### 5.2.5 Zusammenfassung

Die Auswertungen der beiden Ringversuche CCQM-P3 und NMR-2 zeigten ein ähnliches Bild. Die Analysen nach der Arbeitsanweisung führten zu einer deutlichen Verbesserung der Genauigkeit der Methode. Dabei wurden bei beiden Auswertungsarten (Stoffmengenverhältnisse und -anteile) die Komponenten von den meisten Teilnehmern mit einer Richtigkeit von besser als 98 % analysiert. Aus der Mittlung aller Teilnehmerdaten mit Bezug auf die gravimetrischen Referenzwerte wurden für die Analysen von Stoffmengenverhältnisse und -anteilen die relativen Messunsicherheiten ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) zu zwischen 1,2 % und 7 % bestimmt. Lediglich bei der Analyse von Stoffmengenanteilen für die Hauptkomponente wurde eine relative Messunsicherheit von weniger als 0,2 % erzielt. Die Fehler-Analysen der Ergebnisse der Ringversuche zeigten jedoch erhebliche systematische Abweichungen. So traten bei beiden Ringversuchen die folgenden gleichartigen Probleme auf:

1. zu große Analysenwerte bei den drei Komponenten Par, Dur und  $Cy_{12}$  bei der Auswertung als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf  $D_4$ ,
2. zu kleine Analysenwerte des  $D_4$  bei der Auswertung als Stoffmengenanteile und
3. zu geringe ETS-Analysenwerte bei beiden Auswertungsarten.

Um die Messunsicherheit dieser beiden Methoden zu verbessern, ist die Klärung dieser Effekte nötig. Die Ergebnisse sind den Teilnehmern der beiden Ringversuche mitgeteilt worden, wobei zur Vereinfachung nur die Standardunsicherheit betrachtet wurde [64, 65].

## 5.3 Ermittlung von Einflussgrößen

Die im Kapitel 5.2 beschriebenen Abweichungen der Teilnehmerergebnisse von den gravimetrischen Referenzwerten machten die Ermittlung weiterer Einflussgrößen notwendig. Deren Auswirkungen auf die Messunsicherheit der Methode werden wegen der größeren Anzahl an Datenwerten an den Teilnehmerergebnissen des nationalen Ringversuchs NMR-2 diskutiert. Diese gelten adäquat für den internationalen Ringversuch CCQM-P3.

### 5.3.1 Auswertung der Spektren

Die Auswertung der Messprotokolle und der eingesandten Spektren legte bei den Instituten 10, 24, 28, 35, 36 und 37 dar, dass die Spektrenkorrekturen (Grundlinie und Phase) nicht sorgfältig und die Integration entgegen der Messvorschrift durchgeführt wurden. Die bei den Laboratorien 24 und 37 um 1,1 % relativ zu großen Analysenwerte des Durols sind auf die Miterfassung der  $^{13}C$ -Satelliten bei dessen Intensitätsermittlung ohne Berücksichtigung bei der Auswertung zurückzuführen. Die Spektren von Labor 10 enthielten bei 1,10 ppm ein Triplett, bei dem es sich um eine vom Teilnehmer zugeführte Verunreinigung sekundärer Art handelte. Die Miterfassung dieses Signals bei der Auswertung des ETS-Signals bei zwei der

[illegible]

Neben einer schlechten Auflösung (zu breite Signale) weisen diese Spektren signifikante frequenzabhängige Phasenfehler auf, wodurch die Intensitätswerte verfälscht im Spektrum wiedergegeben werden (s. Kapitel 3.2.3). Zudem wurden die Integrationsgrenzen beliebig und von Spektrum zu Spektrum unterschiedlich gesetzt (die Integrationsfaktoren streuen zwischen 5 und 92). Dies bewirkte innerhalb eines Spektrums eine geringe Richtigkeit der wiedergegebenen Intensitäten, wie das Intensitätsverhältnis der beiden ETS-Signale bei ca. 1100 Hz (Quartett) und ca. 200 Hz (Triplett) von 0,05 : 0,18 (Abweichung von ca. 200 % zum natürlichen Verhältnis von 2 : 3) in der Abbildung 5.10 belegt, und zwischen den Spektren eine große Streuung der Analysenergebnisse. Eine derartige Auswertungsroutine muss zwangsläufig zu ungenauen Ergebnissen führen.

### 5.3.2 Integration des ETS (o-Isomer)

Die große Anzahl an Teilnehmer-Werten bei der Komponente ETS im Bereich -2 % bis -6 % relativer Abweichung zum Referenzwert bei beiden Auswertungsarten deuteten auf ein Problem bei der Auswertung dieser Komponente hin. Aus den Angaben der Integrations-

bereiche in den Messprotokollen sowie der Darstellung der Integrale in den beigefügten Spektren war zu entnehmen, dass viele Teilnehmer – entgegen der Arbeitsanweisung – den Integrationsbereich zur vollständigen Erfassung der o-isomeren Verbindung des ETS nicht erweitert hatten. Aufgrund des Anteils des o-Isomeren sollte dies nur zu einem maximal um 2 % relativ zu geringen Analysenwert führen. Eigene Auswertungen zeigten jedoch, dass die Integration des ETS-Signals mit einem Integrationsfaktors von 64 mit anschließender Korrektur des Integralzuges zu einem um 4 % zu geringes Stoffmengenverhältnis des ETS (bezogen auf D<sub>4</sub>) führte (Abbildung 5.11). Ursache für diese Intensitätsverfälschung ist die Korrektur des Integralzuges einer signifikant nicht vollständig erfassten Signalintensität (hier die des o-Isomeren). Die Korrektur des eigentlich steigenden Integralzuges zu einem gerade auslaufenden mittels der SLOPE-Funktion (Veränderung der Steigung der Grundlinie) verfälschte die Signalintensität und führte zu einem zu geringen Analysenwert.

Auch hier zeigte sich, dass bei der Setzung der Integralgrenzen Anforderungen an den Operator zu stellen sind, um richtige Analysenergebnisse zu erzielen. So ist der entsprechend dem Integrationsfaktor berechnete Integrationsbereich auf Signale zu untersuchen, bei denen zur vollständigen Erfassung der Integrationsbereich gegenüber dem Integrationsfaktor zu vergrößern ist.

Verallgemeinernd ist daher zu sagen, dass überlagernde Einzelsignale (hier o- und p-ETS) mit einem Integralzug vollständig zu erfassen sind.

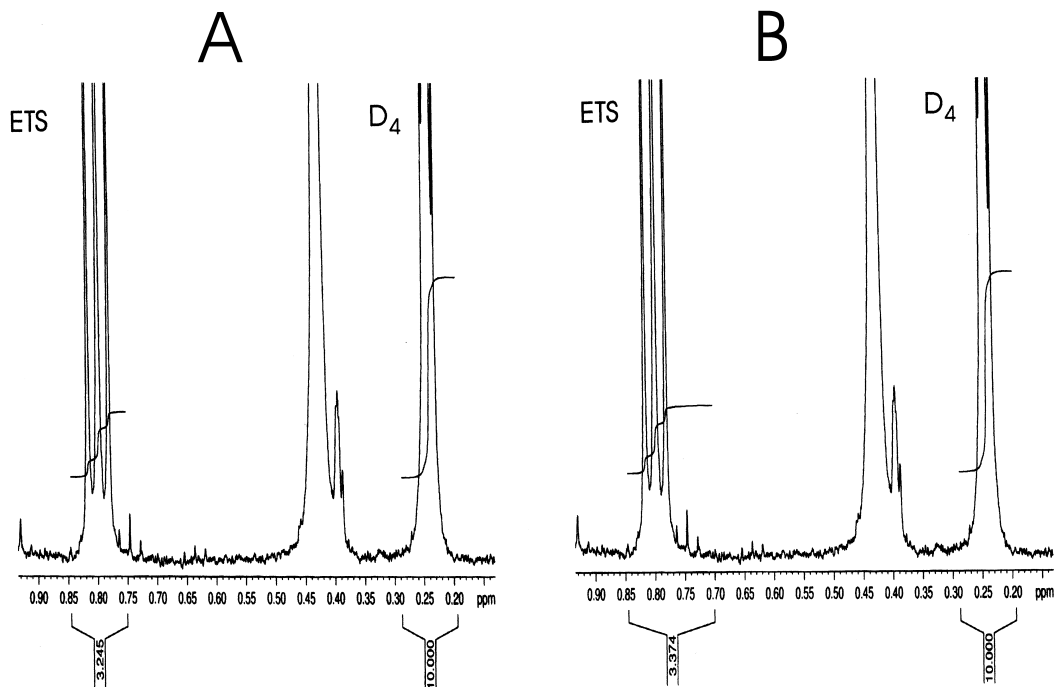


Abbildung 5.11: Vergleich der Intensitätswiedergabe bei der Setzung der Integrationsgrenzen des ETS-Signals und anschließender Korrektur der Integralzüge: A: Integrationsfaktor 64; B: größerer Integrationsbereich zur vollständigen Erfassung des o-Isomeren (0,75 ppm).

### 5.3.3 Spektren- und Filterweite

Die generell zu großen Teilnehmerwerte der 15 Laboratorien (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 24, 25, 27, 28, 34 und 35) bei der Auswertung als Stoffmengenverhältnisse und zugleich zu geringe  $D_4$ -Stoffmengenanteile deuteten auf einen systematischen Fehler bei der Intensitätswiedergabe des  $D_4$  hin.

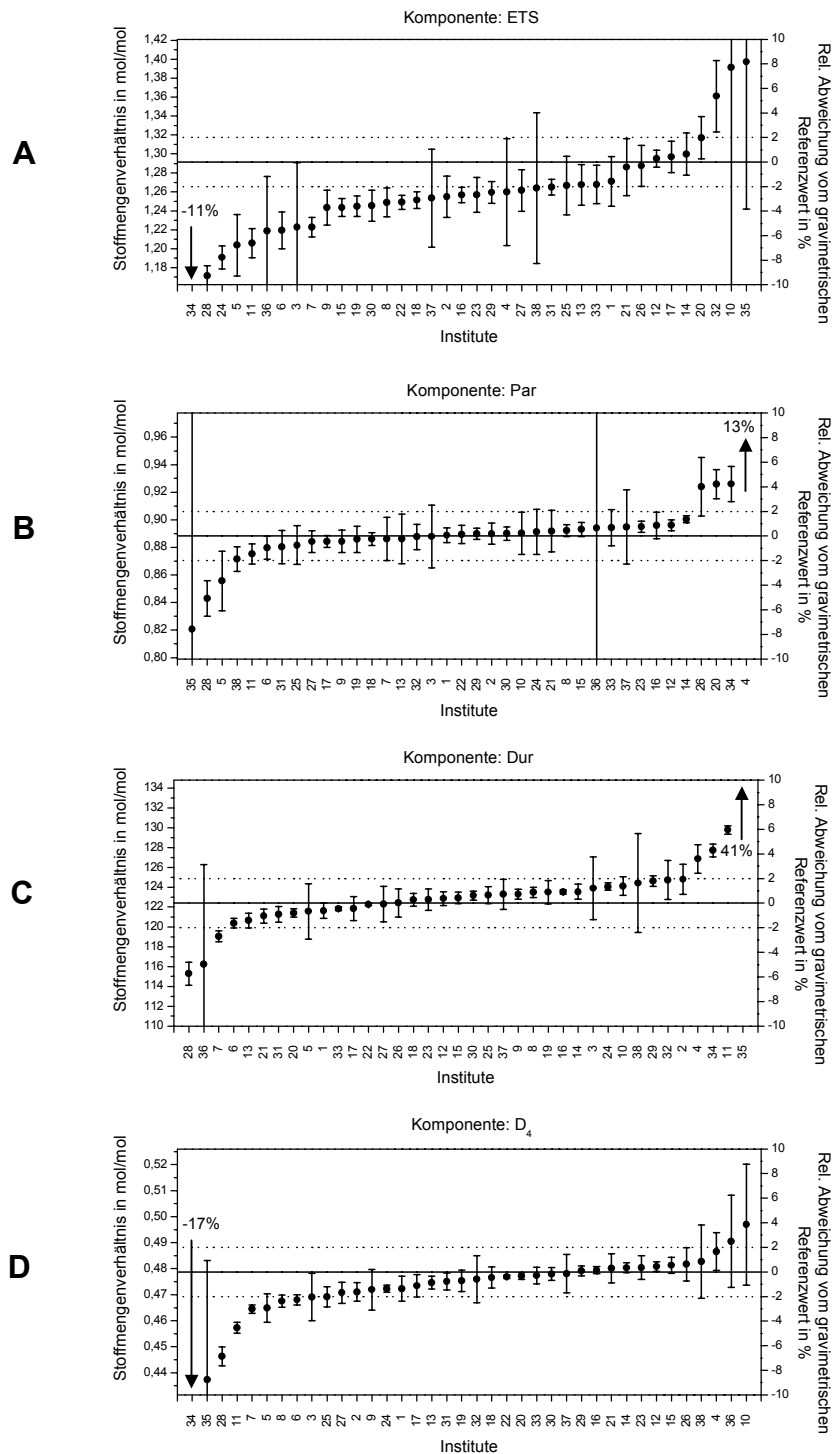


Abbildung 5.12: Ergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 bei der Auswertung als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf  $Cy_{12}$  (A: ETS, B: Par, C: Dur, D:  $D_4$ ).

Dieser bewirkt bei der Berechnung von Stoffmengenverhältnissen bezüglich  $D_4$  zu große Analysenergebnisse. Daher wurden zur Überprüfung dieser Vermutung die Stoffmengenverhältnissen auf einen anderen Standard bezogen neu berechnet. Hierzu eignete sich  $Cy_{12}$  aufgrund seiner Lage im Spektrum am besten. Bei der Auswertung auf  $Cy_{12}$  wurde von oben genannten 15 Laboratorien generell eine nun bessere Richtigkeit erreicht. Allgemein konnten bei dieser Auswertung die Stoffmengenverhältnisse der beiden Komponenten Par und Dur jetzt von fast allen Teilnehmern mit einer Richtigkeit von besser als 98 % bestimmt werden (Abbildung 5.12). Indessen lagen bei der Komponente ETS recht viele Teilnehmerwerte im Bereich  $-2\%$  bis  $-8\%$  relativer Abweichung zum gravimetrischen Referenzwert (wurde im Kapitel 5.3.2 ausführlich behandelt). Es bestätigte sich, dass die zu großen Analysenwerte bei der vorgeschriebenen Auswertungsart auf eine verfälschte Intensitätswiedergabe des  $D_4$  im Spektrum zurückzuführen waren. Ursache hierfür ist der Profil-Verlauf des Analogfilters, der, wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben, die Intensitäten im Grenzbereich liegender Signale (hier  $D_4$ ) partiell reduziert. Bestätigt wird dies in der Abbildung 5.12 durch die zu geringen Analysenergebnisse der Labore 1 bis 11 und 34 bei der Komponente  $D_4$ , die mit Analogfilter ausgestatteten NMR-Spektrometern arbeiteten. Vergleichsmessungen an einem mit einem Analogfilter ausgestatteten Bruker AMX 600 Spektrometer an der Humboldt-Universität zu Berlin (HUB) belegten, dass die vorgegebenen Einstellparametern für die Spektren- und Filterweite von 12 ppm und 14 ppm eine Reduzierung der Intensität des  $D_4$ -Signals im Spektrum durch das Profil des Analogfilters ausübten (hier um 2,1 %). Bei größerer Spektren- und Filterweite von 15 ppm bzw. 33 ppm wurde die  $D_4$ -Intensität im Spektrum richtig wiedergegeben ( $-0,4\%$  relative Abweichung vom gravimetrischen Referenzwert).

Die in den letzten drei Kapiteln diskutierten Einflussgrößen (sorgfältige Korrektur der Spektren, Integration und Filterweiten) erklären den größten Teil der signifikant abweichenden Teilnehmerergebnisse. Schließt man daher bei der Mittelwertbildung die beiden Institute 35 und 36 aufgrund der flüchtigen Auswertung der Spektren (signifikante Nichteinhaltung der Arbeitsanweisung) aus und berechnet die Stoffmengenverhältnisse auf  $Cy_{12}$ , so betragen die daraus ermittelten relativen Messunsicherheiten ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) beider Methoden (Stoffmengenverhältnisse und -anteile) für die Komponenten Par, Dur und  $Cy_{12}$  zu unter 1,5 % (Tabellen 5.10 und 5.11). Die hohe relative Messunsicherheit bei der Komponente ETS von 6 % ist auf den systematischen Fehler der nicht vollständigen Integration des o-Isomeren zurückzuführen (Kapitel 5.3.2). Schließt man die Institute, die mit Analogfiltertechnik ausgestatteten NMR-Spektrometern arbeiteten (Institute 1 bis 11 und 34), bei der Komponente  $D_4$  ebenfalls aus, so liegt die relative Messunsicherheit hier ebenfalls unter 1,5 %. Die bei Dur und  $D_4$  noch auftretenden signifikanten Abweichungen von unter 1 % sind akzeptabel und sollen daher nicht weiter betrachtet werden.

Tabelle 5.10: Fehleranalyse der Ergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 (Stoffmengenverhältnisse bezogen auf  $\text{Cy}_{12}$ ). Auftragung der Mittelwerte (ohne die Institute 35 und 36) und deren Abweichungen von den gravimetrischen Referenzwerten sowie deren Unsicherheiten. Entscheidung über signifikante Abweichungen nach Gleichung 4.16.

Komponente	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	Signifikante Abweichung?
ETS	1,258	0,008	0,034	0,016	ja
Par	0,892	0,005	0,004	0,010	nein
Dur	123,0	0,5	0,6	1,2	nein
D <sub>4</sub> <sup>4</sup>	0,476	0,001	0,003	0,002	ja

Tabelle 5.11: Fehleranalyse der Ergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 (Stoffmengenanteile). Auftragung der Mittelwerte (ohne die Institute 35 und 36) und deren Abweichungen von den gravimetrischen Referenzwerten sowie deren Unsicherheiten. Entscheidung über signifikante Abweichungen nach Gleichung 4.16.

Komponente	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	Signifikante Abweichung?
ETS	0,994	0,006	0,030	0,012	ja
Par	0,705	0,003	0,003	0,06	nein
Dur	97,14	0,01	0,04	0,02	ja
Cy <sub>12</sub>	0,790	0,003	0,003	0,006	nein
D <sub>4</sub> <sup>4</sup>	0,378	0,001	0,002	0,002	nein

#### 5.3.4 Operator-Einfluss

Zur Bewertung des Einflusses des Operators und der unterschiedlichen Gerätetypen wurden die Teilnehmer des NMR-2 Ringversuches um die Zusendung ihrer FIDs (im JCAMP-DX-Format) gebeten. Die von 16 Instituten zur Verfügung gestellten FIDs wurden unter XWinNMR in das Bruker-Format konvertiert und eigenhändig nach Arbeitsanweisung prozessiert, korrigiert und integriert. Dabei sandten die Labor 23 und 32 nur jeweils ein FID zu, so dass hier keine Unsicherheiten berechnet werden konnten. Die Gegenüberstellung der eigenen Analysenergebnisse – Stoffmengenanteile bezogen auf  $\text{Cy}_{12}$  zur Vermeidung der Analog-Filter-Problematik (Tabelle 11.5) – gegen die Originaldaten der Teilnehmer in Abbildung 5.13 verdeutlichten den Einfluss des Operators auf die Messunsicherheit bei Betrachtung derselben Institutsnummer. Besonders beim Labor 28 war der Einfluss des Operators auf die Richtigkeit sowie bei den Laboren 3 und 10 auf die Präzision der Mess-

<sup>4</sup> Ausschluss der Institute 1 bis 11 und 34.

werte erkennbar. Bei der eigenen Prozessierung und Auswertung lagen generell alle Werte in einem Bereich  $\pm 2$  % relativer Abweichung zu den gravimetrischen Referenzwerten. Größere Abweichungen bei der Komponente D<sub>4</sub> waren bei den Laboren 3 und 11 auf die Analogfilter-Technik der eingesetzten NMR-Spektrometer zurückzuführen. Ein Einfluss des verwendeten NMR-Spektrometers war mit Ausnahme des Analog-Filter-Effektes nicht erkennbar.

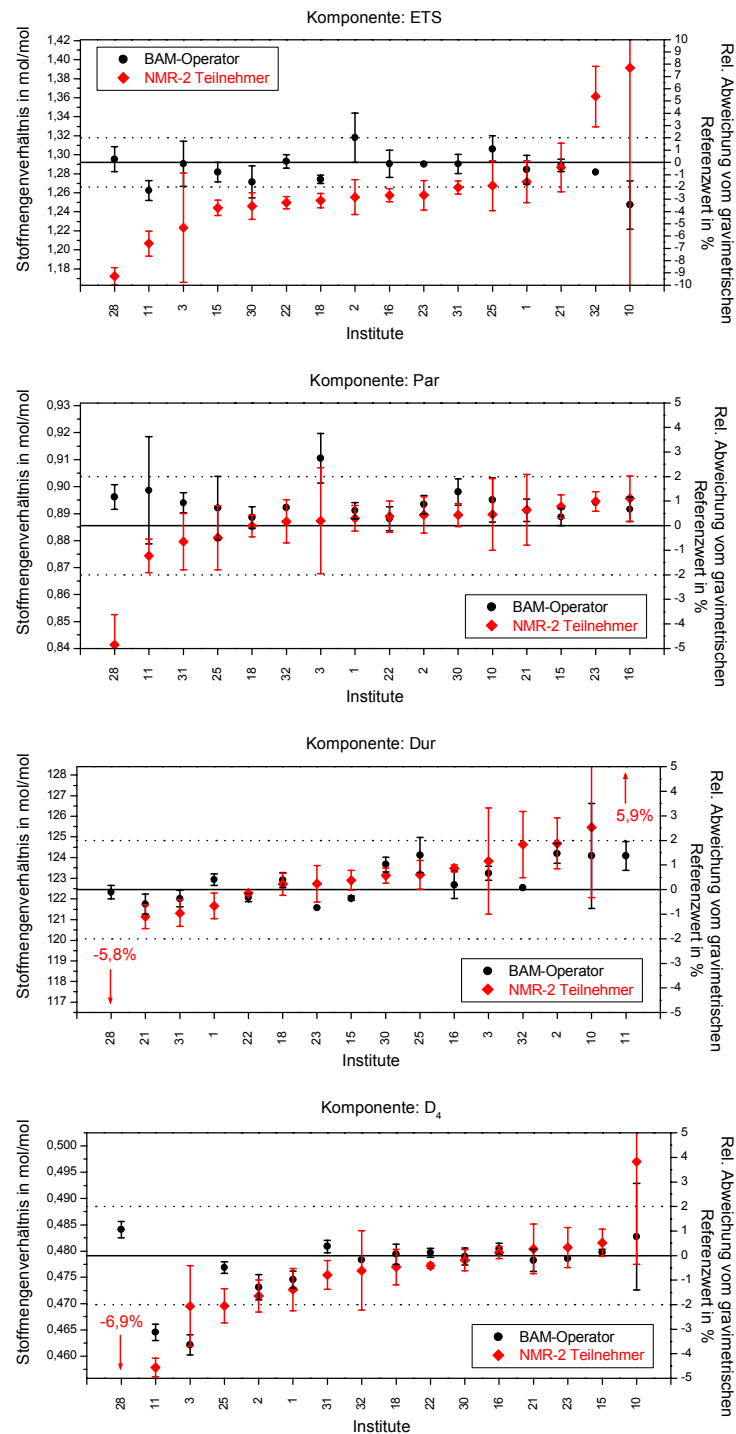


Abbildung 5.13: Gegenüberstellung der Analysenergebnisse der eigenen Auswertung gegen die der Teilnehmer (Auswertung als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf Cy<sub>12</sub>).

Die Fehleranalyse der gemittelten Messwerte der eigenen Auswertungen (Tabelle 5.12) zeigte keine signifikanten Abweichungen auf. Die relative Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) wurde entsprechend Gleichung 4.17 für alle vier Komponenten zu unter 1,5 % bestimmt.

Tabelle 5.12: Fehleranalyse der Ergebnisse bei Auswertung der eingesandten FIDs durch eigene Nachauswertung. (Stoffmengenverhältnisse bezogen auf  $\text{Cy}_{12}$ ). Auftragung der Mittelwerte und deren Abweichungen von den gravimetrischen Referenzwerten sowie deren Unsicherheiten. Entscheidung über signifikante Abweichungen nach Gleichung 4.16.

Komponente	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	Signifikante Abweichung?
ETS	1,290	0,005	0,002	0,010	nein
Par	0,889	0,006	0,003	0,012	nein
Dur	122,9	0,2	0,4	0,5	nein
D <sub>4</sub>	0,477	0,0014	0,002	0,003	nein

Zur weiteren Überprüfung des Einflusses vom eingesetzten NMR-Spektrometer auf die Genauigkeit der Methode wurden eigene Vergleichsmessungen bei der Firma Bruker mit einem 500 MHz und einem 800 MHz NMR-Spektrometer (NMR-2 Lösung) und an der HUB mit einem 300 MHz und einem 600 MHz NMR-Spektrometer (CCQM-P3-Lösung) nach Arbeitsanweisung (Ausnahme 600 MHz NMR-Spektrometer: Spektren- und Filterweite aufgrund Analog-Filter auf 15 ppm bzw. 33 ppm heraufgesetzt) durchgeführt. Die Auswertungen dieser Vergleichsmessungen dokumentieren die Unabhängigkeit der Methode vom eingesetzten Gerät (Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13: Ergebnisse der Vergleichsmessungen zur Ermittlung des Einflusses der Magnetfeldstärke auf die Messunsicherheit der Methode.

Komponente		NMR-2 Lösung			CCQM-P3 Lösung		
		400 MHz (BAM)	500 MHz (Bruker)	800 MHz (Bruker)	400 MHz (BAM)	300 MHz (HUB)	600 MHz (HUB)
ETS	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	2,693	2,692	2,698	1,144	1,142	1,144
	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	0,010	0,003	0,005	0,004	0,005	0,08
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,2	-0,2	0,04	-0,4	-0,5	-0,4
Par	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	1,862	1,867	1,857	0,784	0,790	0,789
	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
	rel. $\Delta x_i$ in %	0,7	1,0	0,4	0,2	0,9	0,8
Dur	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	255,3	253,95	253,86	58,87	59,17	58,26
	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	0,4	0,08	0,14	0,03	0,10	0,09
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,1	-0,7	-0,7	0,01	0,5	-1,0
Cy <sub>12</sub>	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	2,079	2,097	2,092	0,682	0,685	0,682
	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002	0,002
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,4	0,5	0,2	0,4	0,9	0,4



Alle Analysenergebnisse liegen einschließlich ihrer Unsicherheit innerhalb des Bereiches der im Kapitel 5.3.3 ermittelten relativen Messunsicherheit der Methode von 1,5 %. Insgesamt stellte sich heraus, dass der Operator bei der Auswertung der Spektren einen großen, nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Richtigkeit und Präzision des Analysenergebnisses ausübt. Die eigenen Vergleichsmessungen an den verschiedenen NMR-Geräten und ebenso die Auftragung der NMR-2 Ergebnisse sortiert nach Herstellern belegten die Unabhängigkeit der Methode vom Gerätetyp (mit entsprechender Parameterwahl bei Analoggeräten (größere Spektren- und Filterweite)).

### 5.3.5 Auswertungsmethoden und -programme

Als weitere mögliche Einflussgröße bezüglich der Messunsicherheit der Methode kommt die verwendete Software zur Auswertung der Spektren in Frage. Neben den von den Herstellern mitgelieferten Auswertungsprogrammen sind kommerzielle (Origin, Nuts, AMIX, etc.) sowie frei im Internet zugängliche Software-Programme (z. B. MestRe-C<sup>5</sup>) erhältlich, mit denen NMR-Spektren eingelesen und ausgewertet werden können. Aus den Ringversuchsprotokollen war es nicht ersichtlich, welche Programme die Teilnehmer für die Auswertung einsetzten. Daher wurden die im eigenen Labor verfügbaren, von der Firma Bruker mitgelieferten Auswertungsprogramme XWinNMR und WinFit sowie MestRe-C [66] bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit der quantitativen Auswertung von NMR-Spektren untersucht. Den manuellen Korrekturen der Phasen und der Grundlinie wurden die automatischen Korrekturen gegenübergestellt und auf ihre Eignung untersucht. Zur Auswertung wurden die fünf NMR-2 Spektren (Labor 12) den in Tabelle 5.14 aufgeführten Variationen an Auswertungsprogrammen und Korrekturen unterzogen.

Tabelle 5.14: Varianten der Auswertungsprogramme und der Korrekturmaßnahmen (Man.= Manuell; Auto.= Automatik; Entf.= Entfällt).

Korrektur	XWinNMR				MestRe-C			WinFit
	XWN-1	XWN-2	XWN-3	XWN-4	MR-1	MR-2	MR-3	WF
Phasen	Man.	Man.	Auto.	Auto.	Man. <sup>6</sup>	Man. <sup>7</sup>	Auto.	Man. <sup>8</sup>
Grundlinie	Man.	Man.	Auto.	Auto.	Man.	Man.	Auto.	Man. <sup>8</sup>
Integral	Man.	Keine	Keine	Man.	Keine	Keine	Keine	Entf.

<sup>5</sup> <http://qobruue.usc.es/jsgroup/MestRe-C/MestRe-C.html>

<sup>6</sup> Phasenkorrektur erfolgte durch Eingabe der Werte über die Tastatur auf 0,1° genau.

<sup>7</sup> Phasenkorrektur erfolgte über Drehscheibe auf 1° genau.

<sup>8</sup> Manuelle Phasen- und Grundlinienkorrektur erfolgte unter XWinNMR.

Aus den Ergebnissen, in Tabelle 5.15 dargestellt, geht hervor, dass mit XWinNMR bei sorgfältiger manueller Korrektur der Phasen und der Grundlinie präzise und richtige Analysenwerte erhalten wurden unabhängig von der Anwendung der Korrektur der Integralzüge (XWN-1 und XWN-2). Die Korrektur-Algorithmen für die Phasen und die Grundlinie führten trotz mehrfacher Anwendung zu einer zu tief liegenden Basislinie beim ETS-Signal, worauf die Intensität dieses Signals bei der Integration (XWN-3) zu gering wiedergegeben wurde. Durch Korrektur dieser Integralzüge (Ausgleich der Grundlinie) wurden richtige Messergebnisse (XWN-4) erzielt.

Tabelle 5.15: Einfluss der verschiedenen Auswertungsprogramme und Auswertungsmethoden (manuelle Korrekturen gegen die automatischen) auf die Messunsicherheit der Methode.

Komponente		XWN-1	XWN-2	XWN-3	XWN-4	MR-1	MR-2	MR-3	WF
ETS	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	2,693	2,691	2,592	2,682	2,696	2,589	2,083	2,527
	rel. $u(\bar{x}_i)$ in %	0,4	0,4	0,24	0,5	0,6	3	11	1,4
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,1	-0,2	-3,9	-0,6	-0,02	-4,0	-22	-6,3
Par	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	1,862	1,855	1,853	1,861	1,857	1,837	1,561	1,683
	rel. $u(\bar{x}_i)$ in %	0,11	0,16	0,15	0,09	0,4	0,6	10	1,7
	rel. $\Delta x_i$ in %	0,7	0,3	0,2	0,6	0,4	-0,7	-15	-8,9
Dur	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	255,3	254,5	255,6	255,7	254,6	260,1	260,8	248,2
	rel. $u(\bar{x}_i)$ in %	0,15	0,05	0,06	0,16	0,2	0,9	2	1,4
	rel. $\Delta x$ in %	-0,1	-0,4	0,0	0,03	-0,4	1,7	2,0	-2,9
Cy <sub>12</sub>	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	2,079	2,084	2,084	2,079	2,088	2,117	2,093	1,950
	rel. $u(\bar{x}_i)$ in %	0,14	0,07	0,08	0,11	0,19	0,5	2	1,5
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,4	-0,1	-0,1	-0,4	0,1	1,4	0,3	-6,6

Die Software MestRe-C erwies sich für die quantitative Auswertung als ungeeignet. Das Ergebnis der Korrektur-Algorithmen waren Spektren mit eindeutigen Phasen- und Grundlinienfehlern, deren Auswertung zwangsläufig zu ungenauen Ergebnissen (rel. Abweichungen bis zu -22 % und Streuung der Einzelwerte bis zu 11 %) führen musste (MR-3). Ferner blieben bei der manuellen Phasenkorrektur mittels der dafür vorgesehenen Drehscheibe (auf 1° genau) Phasenfehler in den Spektren bestehen (MR-2). Erst bei der manuellen Eingabe der Werte für die Phasenkorrektur auf 0,1° genau (MR-1) waren die Phasenfehler zu korrigieren, worauf richtige und präzise Analysenergebnisse erhalten wurden. Aufgrund der schwierigen Handhabung der Korrektur der Integralzüge wurde bei der Auswertung darauf verzichtet. Die Auswertung mittels WinFit wurde mit einer optimierten Lorentz-Gauß-Linie im Verhältnis 9:1 vorgenommen, die jedoch ebenfalls zu signifikanten Abweichungen der Ergebnisse von den gravimetrischen Referenzwerten führte (relative Abweichungen bis zu -9 %). Ursache hierfür ist die nicht einwandfreie Lorentz-Linienform – bedingt durch Shim-Fehler und B1-Feldinhomogenitäten – der gemessenen Signale, die nicht durch Lorentz-Gauß-Linien simuliert werden können.

Auch hier zeigte sich wieder, dass an den Operator große Anforderungen zu stellen sind, da nur sorgfältige manuelle Korrekturen der Grundlinie und der Phasen im Spektrum zu richtigen und präzisen Analysenergebnissen führen, und somit zu einer geringen Messunsicherheit.

Die Spektrenaufnahme nach Maniara [8], Signale nacheinander mit identischen Parametern in ein Spektrum aufzunehmen, erwies sich aufgrund des schlechteren S/N als nachteilig. Ebenso lieferte die Auswertung mit der Software NMRQuant signifikant abweichende Messergebnisse [14]. Augner diskutierte die nicht ausreichende Genauigkeit der Simulation von Spektren mit WIN-DAISY [67].

### 5.3.6 Messköpfe

Der Ausschluss eines Teilnehmers beim NMR-2 Ringversuch aufgrund eines nicht geeigneten Messkopfes war ausschlaggebend für die Experimente zur Bestimmung des Einflusses vom verwendeten Messkopf auf die Intensitätswiedergabe im Spektrum. Hierzu wurden anhand der NMR-2 Lösung nach Arbeitsanweisung laborintern vier verschiedene Messköpfe (QNP, TXI, 10mm HR, Si-spezial) sowie bei Bruker am 500 MHz Spektrometer ein TXI-Kryo-Messkopf auf ihre quantitativen NMR-Eigenschaften ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.16 als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf D<sub>4</sub> dargestellt.

Tabelle 5.16: Richtigkeit der Analysenergebnisse in Abhängigkeit des Messkopfes.

Komponente		QNP	TXI	10mm HR	Si-spezial	TXI-Kryo
ETS	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	2,693	2,701	2,744	2,758	2,704
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,1	0,2	1,8	2,3	0,2
Par	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	1,862	1,862	1,874	1,947	1,865
	rel. $\Delta x_i$ in %	0,7	0,7	1,3	5,3	0,9
Dur	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	255,3	254,2	272,0	276,9	251,9
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,1	-0,6	6,4	8,3	-1,4
Cy <sub>12</sub>	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	2,079	2,088	2,095	2,188	2,098
	rel. $\Delta x_i$ in %	-0,4	-0,2	0,4	4,8	0,5

Es zeigte sich, dass die für <sup>1</sup>H-NMR-Messungen nicht vorgesehene Messköpfe (10 mm HR und Si-spezial) bei der Aufnahme derartiger Spektren die Intensitäten im Spektrum falsch wiedergeben (relative Abweichungen zu den Referenzwerten von bis zu 9 %). Indessen wurden bei den Messungen mit dem QNP-Messkopf als auch mit den beiden TXI-Messköpfen die Stoffmengenverhältnisse der vier Komponenten durchgängig mit einer Richtigkeit von besser als 99 % wiedergegeben. Lediglich der Analysenwert für das Dur wurde beim TXI-Kryo-Messkopf mit einer relativen Abweichung von -1,4 % ermittelt. Dieses ist jedoch nicht auf die Aufnahme des Spektrums, sondern auf dessen Auswertung

zurückzuführen. Die Hauptkomponente wurde im Spektrum mit einer im Gegensatz zu den anderen Komponenten schlechteren Auflösung (größere Halbwertsbreite  $\nu_{1/2}$ ) wiedergegeben ( $\nu_{1/2}(\text{Dur}) : \nu_{1/2}(\text{D}_4)$  beim TXI-Kryo 8:1 gegenüber beim QNP 1,7:1). Dieser Effekt wird als Radiation Damping bezeichnet und im Kapitel 5.3.7 ausführlicher behandelt. Wegen der Verbreiterung dieses Signals musste aufgrund benachbarter Signale ein kleinerer Integrationsfaktor (14) beim Dur – im Gegensatz zu 32 bei den anderen vier Signalen – angesetzt werden, was zu einer geringeren prozentualen Erfassung der Gesamtintensität des Signals führte, und somit eine signifikant negative Abweichung des Analyseergebnisses bedingte. Angesichts seiner hohen Empfindlichkeit wird dieser Messkopf eher routinemäßig bei Messungen mit stark verdünnten Lösungen bzw. bei Kernspins mit einer geringen natürlichen Häufigkeit eingesetzt, bei denen sich dieser Effekt kaum bzw. gar nicht auswirkt.

Insgesamt wurden mit für die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie konstruierten Messköpfen bei quantitativen Messungen die Intensitäten im Spektrum richtig wiedergegeben. Jedoch ist beim Einsatz eines Kryo-Messkopfes mit einem starken Radiation-Damping-Effekt zu rechnen, der die Auswertung intensiver Signale aufgrund der Signalverbreiterung erschwert. Bei Messköpfen, die nicht speziell für  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen vorgesehen sind, können die Intensitäten im Spektrum verfälscht wiedergegeben werden.

### 5.3.7 Radiation Damping

Der im Kapitel 5.3.6 erwähnte Effekt des Radiation Dampings wurde erstmals 1954 [68] in der Literatur erwähnt. Es beschreibt einen zusätzlichen Relaxations-Mechanismus  $T_{rd}$  beruhend auf der Wechselwirkung zwischen der transversalen Magnetisierung der Messprobe und der RF-Spule. Hierbei wird  $T_{rd}$  durch die folgende Gleichung definiert:

$$T_{rd} = \frac{2\varepsilon_0 c^2}{\gamma f Q B_0}, \quad (5.1)$$

wobei  $f$  den Füllfaktor und  $Q$  den Qualitätsfaktor des Probenkopfes wiedergibt [69]. Das dabei erzeugte entgegenwirkende Magnetfeld  $B_{rd}$  wird durch die Gleichung

$$\gamma B_{rd} = -\frac{\sin \alpha}{T_{rd}} \quad (5.2)$$

in Abhängigkeit vom Anregungswinkel und  $T_{rd}$  beschrieben. Detaillierte Informationen über das Radiation Damping sind dargestellt in [70, 71, 72].

Für die meisten Proben und Kernarten ist das Radiation Damping ein schwacher, gegenüber den anderen Relaxations-Mechanismen ( $T_1$  und  $T_2$ ) zu vernachlässigender Effekt. In den letzten Jahren wurde es jedoch aufgrund der immer stärker werdenden Magnetfeldern sowie der empfindlicheren Messköpfe zu einem bei der  $^1\text{H}$ -NMR nicht mehr zu vernachlässigenden

physikalischen Phänomen, das sich unter anderem auf die Linienbreite (Verbreiterung) intensiver Signale im Spektrum auswirkt [73].

Beim Vergleich der Messköpfe im Kapitel 5.3.6 stellte sich heraus, dass die Halbwertsbreite des intensivsten Signals (Dur) – dargestellt als Verhältnis der Halbwertsbreiten zwischen Dur und  $D_4$  – mit der Empfindlichkeit des Messkopfes von 1,7:1 beim QNP- über 2,1:1 beim TXI- bis 8:1 beim TXI-Kryo-Messkopf zunahm. Dasselbe Verhalten zeigte sich mit der Zunahme der Magnetfeldstärke (Kapitel 5.3.4) von 2,1:1 bei 9,4 T über 2,4:1 bei 11,7 T bis zu 3,2:1 bei 18,8 T. Die Ergebnisse in den Kapiteln 5.3.4 und 5.3.6 zeigen, dass das Radiation Damping eine Verbreiterung intensiver Signale, jedoch keine Verfälschung von deren Intensitäten im Spektrum bewirkt.

### 5.3.8 Zusammenfassung

Aufgrund bei der Fehleranalyse der Ringversuchsergebnisse festgestellten erheblichen systematischen Abweichungen bezüglich der gravimetrischen Referenzwerte wurden folgende Einflussgrößen umfangreich untersucht:

- Analogfilter sättigen partiell in der Nähe der Filtergrenzen liegende Signale (hier  $D_4$ ). Eigene Messungen zeigten, dass bei einem Signalabstand von mindestens 10 ppm zur Filtergrenze die Intensitäten im Spektrum richtig wiedergegeben werden.
- Der Einfluss des Operators bei der Auswertung der Spektrum auf die Messunsicherheit ist enorm. Mangelhafte Korrekturen der Grundlinie und Phasen sowie die Nichteinhaltung eines konstanten Integrationsfaktor (hier 64) innerhalb eines Spektrums führten zu relativen Abweichungen der Analysenergebnisse von bis zu 55 %. Ferner wurden bei nichtvollständiger Integration des o-Isomeren beim ETS und anschließender Korrektur des Integralzuges zu geringe Intensitätswerte ermittelt.
- Die automatischen Korrekturalgorithmen (Grundlinie, Phase) der Programme XWinNMR und MestRe-C sind für quantitative Zwecke nicht ausreichend und führten zu einer erhöhten Messunsicherheit der Methode. Ebenso lieferte das Anfitten mit simulierten Lorentz-Gauß-Kurven mittels WinFit von den gravimetrischen Referenzwerten erheblich abweichende Analysenergebnisse.
- Die untersuchten Messköpfe, die nicht speziell für  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen vorgesehen sind, gaben die Signalintensitäten im Spektrum verfälscht wieder.

Der Einsatz von modernen NMR-Spektrometern und Kryo-Messköpfen führte zu Radiation Damping-Effekten (Linienverbreiterung) bei intensiven Signalen. Ein Einfluss auf die Signalintensität konnte nicht festgestellt werden. Allgemein wurde die Unabhängigkeit der Messunsicherheit von der Magnetfeldstärke des eingesetzten NMR-Spektrometers gezeigt.

Anhand der ermittelten Einflussgrößen wurden zur Berechnung der Messunsicherheit der Methoden (Stoffmengenverhältnis, -anteile) Institute, die bei der Auswertung der Spektren

sich definitiv nicht an die Arbeitsvorschrift hielten, ausgeschlossen. Ferner wurden die Stoffmengenverhältnisse auf  $\text{Cy}_{12}$  bezogen, um das Problem der interner Referenzierung zu lösen. Aus den so gemittelten Teilnehmerergebnissen des Ringversuches NMR-2 wurde für beide Methoden eine relative Messunsicherheit von unter 1,5 % bestimmt (Ausschluss der Teilnehmer mit Analogfilter-NMR-Spektrometer bei der Komponente  $\text{D}_4$ ).

Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen wurden den Teilnehmern auf einem vom Labor I.31 der BAM veranstalteten Workshop vorgestellt und gemeinsam diskutiert [74].

## 5.4 Modell-Mixturen mit überlagerten Signalen

Die bisher in den Kapiteln 5.2 und 5.3 betrachteten Modell-Lösungen enthielten jeweils einzeln integrierbare Signale im Spektrum. Oftmals weisen die Spektren realer Proben überlagerte Signale auf, deren Auswertungsweise und die dabei erreichbare Genauigkeit in diesem Kapitel ermittelt werden soll.

### 5.4.1 Benzoesäure - Ethylbenzoat

Zuerst sollte ein System untersucht werden, bei dem sich die Signale der einen Komponente mit einigen, nicht allen Signalen der anderen Komponente überlagern.

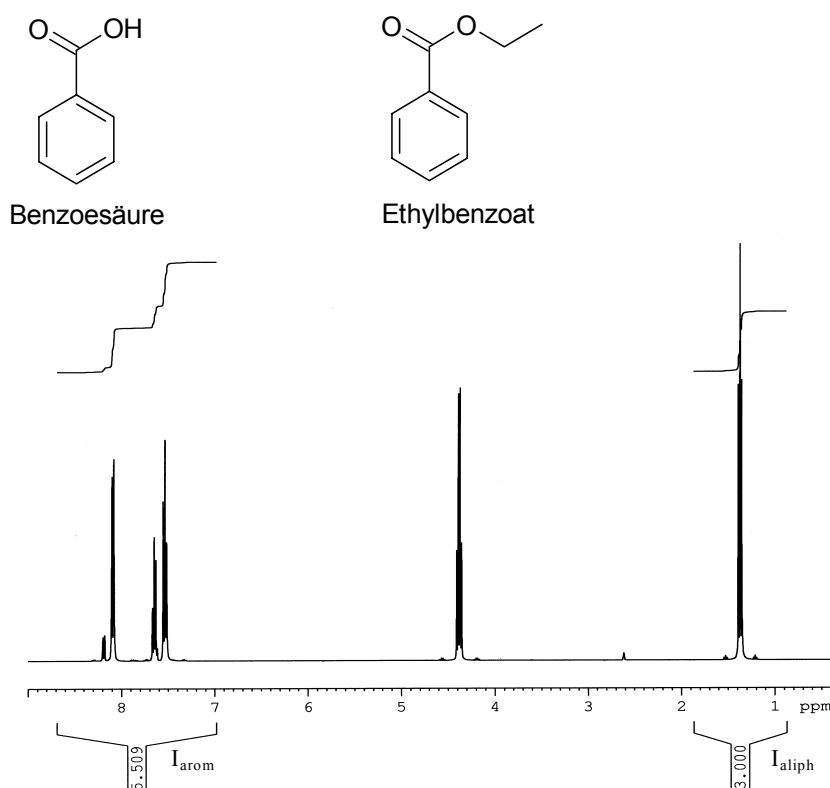


Abbildung 5.14: Strukturen und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Benzoesäure und des Ethylbenzoats.

Das untersuchte Modell-System, bestehend aus Benzoesäure und Ethylbenzoat, zeigt ein Spektrum, bei dem sich die aromatischen Protonensignale (7,5 - 8,2 ppm) der Benzoesäure mit denen des Ethylbenzoats überlagern, indessen letzteres zusätzlich aliphatische Protonensignale (CH<sub>3</sub> bei 1,4 ppm und CH<sub>2</sub> 4,4 ppm) im Spektrum aufweist (Abbildung 5.14). Die Intensität des aliphatischen Signals bei 1,4 ppm  $I_{aliph}$  gibt die Methyl-Protonen des Ethylbenzoats wieder. Dagegen werden in der Intensität der aromatischen Signale  $I_{arom}$  die aromatischen Protonen beider Substanzen berücksichtigt. Aus der Kenntnis der Intensität der aliphatischen Signale des Ethylbenzoats kann durch entsprechende Gewichtung die Intensität der aromatischen Ethylbenzoat-Protonen berechnet werden. Die Differenz aus der Intensität aller aromatischen Protonen und der Intensität der aromatischen Ethylbenzoat-Protonen gibt die Intensität der aromatischen Protonen der Benzoesäure nach folgender Gleichung wieder:

$$I_{Benzoesäure} = I_{arom} - \frac{5}{3} \cdot I_{aliph} . \quad (5.3)$$

Demzufolge berechnet sich das Stoffmengenverhältnis entsprechend nach Gleichung (3.11):

$$\frac{n_{Ethylbenzoat}}{n_{Benzoesäure}} = \frac{I_{aliph}}{I_{arom} - \frac{5}{3} I_{aliph}} \cdot \frac{5}{3} . \quad (5.4)$$

Zur Bestimmung der metrologischen Qualität dieser Auswertungsweise wurden fünf sich im Stoffmengenverhältnis unterscheidende Modell-Lösungen (10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10) in deuteriertem DMSO-d<sub>6</sub> angesetzt und je viermal mit dem Standardparameter-Satz (Tabelle 5.1, D1= 30 s; ns= 16) gemessen und nach Arbeitsanweisung ausgewertet (Integrationsfaktor: 400). Die Fehleranalyse der Analysenergebnisse bezüglich der gravimetrischen Referenzwerte (Gleichung 4.16) zeigte bei drei Lösungen (2, 4 und 5) akzeptable Abweichungen (< 1% relativ), die anderen beiden sind im Vergleich zur Standardunsicherheit unerheblich (Tabelle 5.17).

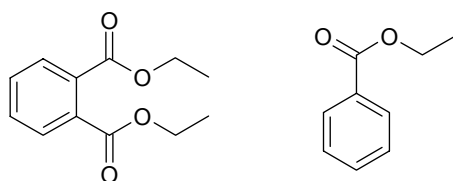
Tabelle 5.17: Relative Messunsicherheit der Methode bei Auswertung überlagerter Signale durch Differenzbildung (Benzoesäure und Ethylbenzoat).

$x_{Ref}$ in mol mol <sup>-1</sup>	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$\frac{n_{Ethylbenzoat}}{n_{Benzoesäure}}$			
		$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	rel. $U$ in % ( $k=2$ ; $p=95\%$ )
(1) 9,807 ± 0,003	9,790	0,012	0,017	0,024	0,4
(2) 4,891 ± 0,002	4,935	0,003	0,044	0,007	1,8
(3) 1,0949 ± 0,0003	1,093	0,002	0,002	0,007	0,5
(4) 0,1934 ± 0,0001	0,1945	0,0001	0,0011	0,0003	1,1
(5) 0,10751 ± 0,00003	0,10792	0,00004	0,00041	0,0001	0,8

Nach Gleichung 4.17 ergab sich somit aus den Standardunsicherheiten der Analysen- und Referenzwerte sowie den Abweichungen der Analysenwerte von den Referenzwerten generell eine relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) dieses Verfahrens von zu unter 1,5 %. Lediglich bei Lösung 2 wurde eine geringere Messunsicherheit von 1,8 % ermittelt.

#### 5.4.2 Ethylbenzoat - Phthalsäurediethylester

Anhand von Ethylbenzoat und Phthalsäurediethylester soll ein System betrachtet werden, bei dem nur überlagerte Signale auftreten, die intramolekularen Protonenverhältnisse der Signale der beiden Komponenten sich aber voneinander unterscheiden (Abbildung 5.15).



Phthalsäurediethylester

Ethylbenzoat

Abbildung 5.15: Strukturformeln von Phthalsäurediethylester und Ethylbenzoat.

Die Intensität des Integrals der aromatischen Protonensignale  $I_{arom}$  setzt sich entsprechend den jeweiligen Stoffmengen gewichtet aus den vier aromatischen Protonen des Phthalsäurediethylesters und den fünf aromatischen Protonen des Ethylbenzoats zusammen. Folgerichtig ergeben die drei aliphatischen  $\text{CH}_3$ -Protonen des Ethylbenzoats und die sechs aliphatischen  $\text{CH}_3$ -Protonen die Intensität der aliphatischen  $\text{CH}_3$ -Signale  $I_{aliph}$  (Abbildung 5.16).

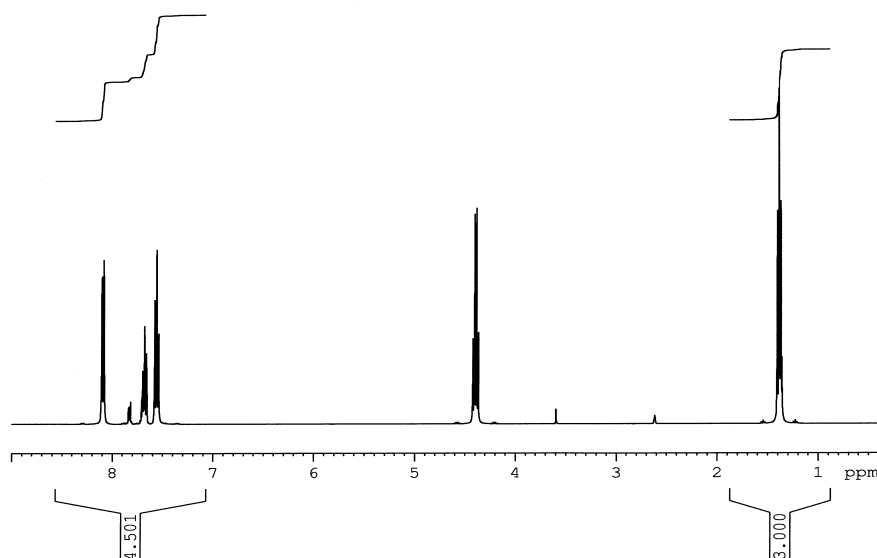


Abbildung 5.16: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Modell-Lösung bestehend aus Ethylbenzoat und Phthalsäurediethylester.



Demzufolge erhält man folgendes lösbares Gleichungssystem mit zwei Gleichungen und zwei unbekannten Variablen  $x$  (Ethylbenzoat) und  $y$  (Phthalsäurediethylester):

$$\begin{aligned} I : \quad I_{arom} &= 5x + 4y \\ II : \quad I_{aliph} &= 3x + 6y \end{aligned} \quad (5.5)$$

Als Lösung dieses Gleichungssystems erhält man:

$$\begin{aligned} I : \quad y &= \frac{\frac{5}{3}I_{aliph} - I_{arom}}{6} \\ II : \quad x &= \frac{I_{aliph}}{3} - 2 \cdot y \end{aligned} \quad (5.6)$$

Das Stoffmengenverhältnis berechnet sich dann demzufolge:

$$\frac{n_{Ethylbenzoat}}{n_{Phthalsäurediethylester}} = \frac{x}{y} = \frac{\frac{I_{aliph}}{3} - 2 \left( \frac{\frac{5}{3}I_{aliph} - I_{arom}}{6} \right)}{\frac{\frac{5}{3}I_{aliph} - I_{arom}}{6}} \quad (5.7)$$

Entsprechend dem Vorgehen in Kapitel 5.4.1 wurden fünf Lösungen mit äquivalenten Stoffmengenverhältnissen in DMSO- $d_6$  angesetzt und ausgewertet. Die Fehleranalyse der Analysenergebnisse bezüglich der gravimetrischen Referenzwerte (Gleichung 4.16) zeigte generell akzeptable Abweichungen ( $\leq 1\%$  relativ) (Tabelle 5.18).

Tabelle 5.18: Relative Messunsicherheit der Methode bei Auswertung überlagerter Signale mittels eines Gleichungssystems (Ethylbenzoat und Phthalsäurediethylester).

$x_{Ref}$ in mol mol <sup>-1</sup>	$\frac{n_{Ethylbenzoat}}{n_{Phthalsäurediethylester}}$					rel. $U$ in % ( $k=2$ ; $p=95\%$ )
	$\bar{x}_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$u(\bar{x}_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>	$ \Delta x_i $ in mol mol <sup>-1</sup>	$2u(\Delta x_i)$ in mol mol <sup>-1</sup>		
(1) 10,072 ± 0,003	10,018	0,011	0,054	0,023		1,1
(2) 4,854 ± 0,002	4,805	0,004	0,049	0,009		2
(3) 1,2208 ± 0,0004	1,2249	0,0005	0,0041	0,0013		0,7
(4) 0,25191 ± 0,0006	0,2544	0,0002	0,0025	0,0013		2
(5) 0,11889 ± 0,00003	0,1185	0,0006	0,0004	0,0012		1,2

Nach Gleichung 4.17 ergab sich somit aus den Standardunsicherheiten der Analysen- und Referenzwerte sowie den Abweichungen der Analysenwerte von den Referenzwerten generell eine relative Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) dieses Verfahrens von zu 2 %. Diese gegenüber den einfachen Verfahren von der Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen leicht erhöhte Messunsicherheit war auf die umfangreichere Messgleichung zurückzuführen, in der die Intensitätswerte mehrfach eingehen.

### 5.4.3 Xylol-Isomere

Der schwierigste anzunehmende Fall ist die Auswertung eines Spektrums, bei dem nur überlagerte Signale auftreten und deren Komponenten sich nicht im intramolekularen Protonenverhältnis der Signalgruppen unterscheiden. Als Modell-System ist hier eine Lösung bestehend aus den drei Stellungsisomeren o-, m- und p-Xylol unter Zusatz des Konstitutionsisomeren Ethylbenzol untersucht worden (Abbildung 5.17).

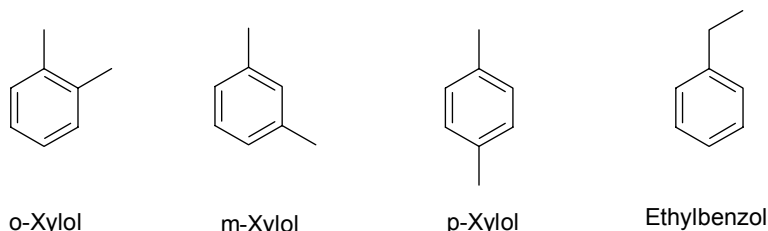


Abbildung 5.17: Strukturformeln der drei Stellungsisomeren o-, m- und p-Xylol und des Konstitutionsisomeren Ethylbenzols.

Die Abbildung 5.18 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer Lösung, die 61,2 mg Ethylbenzol, 148,0 mg p-Xylol, 92,6 mg m-Xylol und 65,6 mg o-Xylol enthält. Während die aliphatischen Signale des Ethylbenzols einzeln ausgewertet werden können, ist dies bei den übrigen Signalen wegen der Überlagerung der aromatischen Signale aller vier Komponenten und der aliphatischen Signale der drei Xylole (die eindeutige qualitative Zuordnung der Signale erfolgte mittels Handversuchen) nicht möglich.

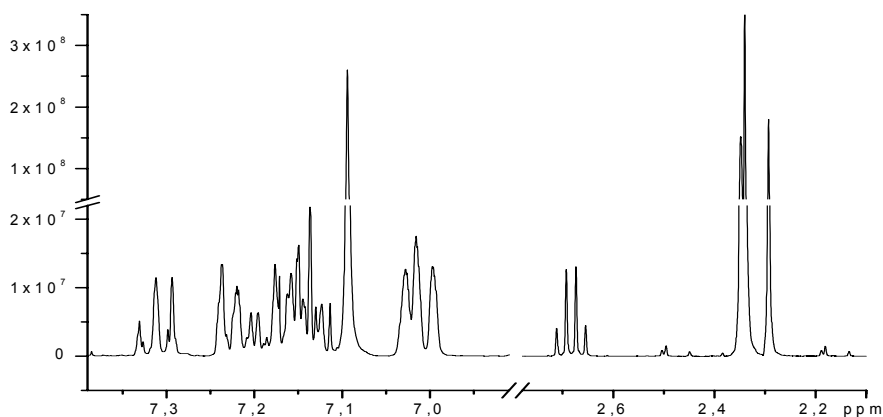


Abbildung 5.18:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz) der Xylole (o, m und p). Abszisse und Ordinate sind zu besserer Darstellung unterbrochen worden.

Aufgrund der identischen Verhältnisse zwischen aromatischer und aliphatischer Protonenzahl der drei Xylole ist die Bestimmung mittels Gleichungssystems hier nicht möglich. Die Auswertung der aliphatischen  $\text{CH}_3$ -Signale mittels WinFit lieferte erheblich abweichende Analysenwerte (relative Abweichungen von bis zu 4 % hinsichtlich der gravimetrischen Referenzwerten). In den folgenden drei Kapiteln werden Versuche zur Trennung der aliphatischen Signale mittels Lösungsmittelwechsel, Verschiebungsreagenz und größerem Magnetfeld diskutiert.

### 5.4.3.1 Einfluss des Lösungsmittels

Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelösten Molekülen führen häufig zu Signalverschiebungen im Spektrum [16]. Zum Erhalt möglichst extremer Lösungsmittelleffekte wurde die Xylol-Ethylbenzol-Lösung mit unpolaren ( $\text{CCl}_4$  und  $\text{CDCl}_3$ ) sowie mit einem Lösungsmittel ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) verdünnt, das einen starken Anisotropie-Effekt bewirkt. Die in der Tabelle 5.19 dargestellten Signal-Lagen der aliphatischen Signale zeigen zwischen den beiden unpolaren Lösungsmitteln zu vernachlässigende Unterschiede auf. Hingegen veränderte sich beim Benzol- $\text{d}_6$  neben der absoluten Lage aller Signale um ca. 0,2 ppm Richtung Tieffeld auch signifikant die Signalabstände untereinander, so dass hier eine vollständige Überlagerung der m- und p-Xylol-Signale auftrat.

Tabelle 5.19: Einfluss des Lösungsmittels auf die Lagen aliphatischer Signale der Xylole im Spektrum.

Lösungsmittel	Signal-Lage in ppm,			Signalabstand zum p-Xylol in ppm	
	o-Xylol	m-Xylol	p-Xylol	o-Xylol	m-Xylol
$\text{CDCl}_3$	2,29	2,35	2,34	0,05	0,01
$\text{CCl}_4$	2,30	2,36	2,35	0,05	0,01
$\text{C}_6\text{D}_6$	2,03	2,14	2,14	0,11	0

Der Wechsel von einem unpolaren zu einem Lösungsmittel, welches einen starken Anisotropie-Effekt bewirkte, führte zur einer insgesamt schlechteren Konstellation der Signal-Lagen im Spektrum.

### 5.4.3.2 Einsatz von Verschiebungsreagenzien

Die Anwendung von Verschiebungsreagenzien (Lanthaniden-Komplexe) ist in der qualitativen NMR-Spektroskopie ein gängiges Verfahren zur Vereinfachung von Spektren mit überlagerten Signalen und geht auf Hinckley [75] zurück. Das Fehlen von Donor-Atomen wie z.B. Sauerstoff oder Stickstoff bei dem hier betrachteten Modell-System verhindert die Bildung des notwendigen Komplexes.

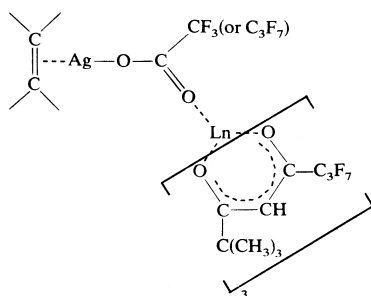


Abbildung 5.19: Schematische Darstellung der Bindung des Silber-Lanthaniden-Komplexes an ein Alken (entnommen aus [77]).

Erst durch die zusätzliche Verwendung von Silbersalzen war es Evans et al. [76] gelungen, an Alkenen paramagnetische Shifts zu bewirken. Die Abbildung 5.19 gibt schematisch die Koordinierung des Silber-Lanthaniden-Komplexes an eine  $\pi$ -Bindung wieder. Dambska und Janowski setzen erfolgreich Silbertrifluoracetat ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$ ) und Tris-[1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-7,7-dimethyl-4,6-oktandionat]-Europium ( $\text{Eu}(\text{fod})_3$ ) zur quantitativen Analyse von m- und p-Xylol in Tetrachlorkohlenstoff ein [78]. Um den Einfluss von Shiftreagenzien (in Abhängigkeit vom Stoffmengenverhältnis Shiftreagenz zu Xylol) auf ein Gemisch aus den drei stellungsisomeren Xylen zu untersuchen, wurden entsprechend den Vorgaben von Dambska und Janowski im molaren Verhältnis 1:1 angesetzte Lösungen aus dem jeweiligen Shiftreagenz ( $\text{Eu}(\text{fod})_3$  bzw.  $\text{Pr}(\text{fod})_3$ ) und Silbertrifluoracetat mit der Xylol-Lösung in molaren Verhältnissen von 0,1:1, 0,25:1, 0,5:1, 1:1 und 2:1 versetzt, zwei Tage stehen gelassen, filtriert und die Filtrate in NMR-Röhrchen gemessen. Es zeigte sich, dass der tieffeldverschiebende Einfluss des  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  sowie der hochfeldverschiebende Einfluss des  $\text{Pr}(\text{fod})_3$  sich auf die aliphatischen Protonen des o-Xylols am stärksten und auf die des p-Xylols am schwächsten ausübt. Die dadurch erhaltenden Signalabstände der drei aliphatischen  $\text{CH}_3$ -Signale zueinander sind in Tabelle 5.20 erfasst.

Tabelle 5.20: Einfluss des Verschiebungsreagenz auf die Lage der aliphatischen Signale der Xylene im Spektrum in Abhängigkeit vom Stoffmengenverhältnis Shiftreagenz zu Analyt.

$\frac{n_{\text{Verschiebungsreagenz-Komplex}}}{n_{\text{Xylol}}}$ in mol mol <sup>-1</sup>	Shiftreagenz: $\text{Eu}(\text{fod})_3$				Shiftreagenz: $\text{Pr}(\text{fod})_3$			
	Signalabstand o- zu p-Xylol		Signalabstand m- zu p-Xylol		Signalabstand o- zu p-Xylol		Signalabstand m- zu p-Xylol	
	in ppm	in Hz	in ppm	in Hz	in ppm	in Hz	in ppm	in Hz
---	0,05	18	0,01	3,2	0,05	18	0,01	3,2
0,1 : 1	0,01	4,0	0,02	9,4	0,13	51	0,03	11
0,25 : 1	0,02	5,9	0,04	14	0,19	77	0,06	23
0,5 : 1	0,04	15	0,05	18	0,19	75	0,06	23
1 : 1	0,06	25	0,06	25	0,25	99	0,08	31
2 : 1	0,07	27	0,07	27	0,21	85	0,07	29

$\text{Pr}(\text{fod})_3$  erwies sich hierbei als das bessere Verschiebungsreagenz. Die größten Signalabstände wurden bei einem molaren Verhältnis zwischen 1 : 1 und 2 : 1 (Shiftreagenz zu Xylol) erreicht. Dies widerspricht der Arbeit von Dambska und Janowski [78], die ein Stoffmengenverhältnis von 0,2 bis 0,25 zu 1 ( $\text{Eu}(\text{fod})_3$  zu Xylol) als optimal zur Trennung der aliphatischen  $\text{CH}_3$ -Signale von m- und p-Xylol beschrieben. Die erreichten Abstände sind für qualitative Unterscheidung ausreichend, nicht jedoch für quantitative Analysen, da bei einer Halbwertsbreite von ca. 1,3 Hz der aliphatischen Signale ein Integrationsfaktor von 64 nicht zur einzelnen Auswertung der Signale eingesetzt werden kann. Des Weiteren wäre der Einfluss der aufwendigen Probenpräparation (Filtration) auf die Messunsicherheit des Verfahrens festzustellen.

Eine quantitative Auswertung der drei Xylol-Isomere unter den in dieser Arbeit vorgegebenen Bedingungen (Integrationsfaktor: 64) ist also auch mit Verschiebungsreagenzien nicht möglich.

#### 5.4.3.3 Größere Magnetfeldstärke

Eine weitere Möglichkeit, die Abstände (in Hz) zwischen zwei Signalen zu vergrößern, ist die Messung bei höherem Magnetfeld. Hierzu wurde bei der Firma Bruker die Xylol-Lösung in  $\text{CDCl}_3$  an einem 18,8 T NMR-Spektrometer ( $^1\text{H}$ : 800 MHz) aufgenommen. Der erwartete Vorteil durch die größeren Abstände der Signale (in Hz) wegen der doppelten Messfrequenz wurde angesichts der schlechteren Auflösung (doppelt so breite Signale) kompensiert (Tabelle 5.21).

Tabelle 5.21: Vergleich der Signalabstände und Halbwertsbreiten der Xylol-Isomere bei 400 MHz und 800 MHz NMR-Spektrometern.

	400 MHz (BAM)			800 MHz (Bruker)		
	Signalabstand zum p-Xylol in ppm	in Hz	Halbwerts- breite in Hz	Signalabstand zum p-Xylol in ppm	in Hz	Halbwerts- breite in Hz
o-Xylol	0,05	19	1,0	0,04	35	1,8
m-Xylol	0,008	3,2	1,2	0,009	6,9	2,4
p-Xylol	–	–	1,1	–	–	1,8

Insgesamt stellte sich bei den Untersuchungen heraus, dass mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR eine quantitative Auswertung der drei Xylol-Isomere unter den in dieser Arbeit geforderten Auswertebedingungen (Integrationsfaktor von 64) nicht möglich ist. Auf den Einsatz der  $^{13}\text{C}$ -NMR zur Bestimmung der Reinheit von Xylenen wird in Kapitel 6.2.1 eingegangen.

## 5.5 Unsicherheitsbudget

Das Unsicherheitsbudget enthält bei der Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen wegen der einfachen Probenpräparation nur einen Unsicherheitsbeitrag, das Verhältnis der beiden Intensitätswerte, dessen Unsicherheit sich aus den Einzelmessungen nach Gleichung (4.1) ableitet. Anders sieht es bei der Analyse von Stoffmengenanteile von mindestens drei Komponenten aus. Hierbei gehen nach Gleichung (3.12) die Intensitätswerte aller auszuwertenden Substanzen in das Analysenergebnis einer Komponente ein. Die Korrelation zwischen diesen Ausgangsgrößen wurde bereits im Rahmen des nationalen Ringversuches NMR-1 nachgewiesen [14]. Der GUM schreibt bei korrelierenden Ausgangsgrößen vor, zusätzlich zum Ergebnis die Kovarianzmatrix oder die Matrix der Korrelationskoeffizienten mitanzugeben [11, Kapitel 7.2.5]. Letztere wird für  $m$  Komponenten in folgender Form angegeben:

$$\begin{pmatrix} 1 & r_{1,2} & r_{1,3} & \cdots & r_{1,m} \\ r_{2,1} & 1 & r_{2,3} & \cdots & r_{2,m} \\ r_{3,1} & r_{3,2} & 1 & \cdots & r_{3,m} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ r_{m,1} & r_{m,2} & r_{m,3} & \cdots & 1 \end{pmatrix}. \quad (5.8)$$

Hierbei gibt  $r_{ij}$  die Korrelation zwischen der Komponente  $i$  und der Komponente  $j$  wieder. Berechnet werden diese, indem die Kovarianz  $u(\bar{x}_i, \bar{x}_j)$  durch die jeweiligen Standardunsicherheiten der beiden Komponenten dividiert wird:

$$r_{i,j} = \frac{u(\bar{x}_i, \bar{x}_j)}{u(\bar{x}_i) \cdot u(\bar{x}_j)}. \quad (5.9)$$

Die Kovarianz wiederum berechnet sich wie folgt:

$$u(\bar{x}_i, \bar{x}_j) = \frac{1}{n(n-1)} \cdot \sum_{p=1}^n (x_{ip} - \bar{x}_i)(x_{jp} - \bar{x}_j). \quad (5.10)$$

Der Korrelationskoeffizient ist dimensionslos und nimmt nur Werte zwischen +1 und -1 an. Hierbei gibt ein Betrag von eins eine streng lineare Abhängigkeit an. Bei positiven Werten liegt eine gleichgesinnte, bei negativen eine entgegengesinnte Korrelation vor. Im Falle von  $|r_{ij}| < 0,1$  kann die Korrelation zwischen den beiden Komponenten vernachlässigt werden. Dies bedeutet aber nicht, dass sie voneinander unabhängig sind. Als Beispiel wurde aus den eigenen Messdaten von NMR-2 die Korrelationsmatrix berechnet:

$$\begin{pmatrix} & ETS & Par & Dur & Cy_{12} & D_4 \\ ETS & 1 & 0,3 & -0,9 & 0,8 & 0,2 \\ Par & 0,3 & 1 & -0,7 & 0,8 & 1 \\ Dur & -0,9 & -0,7 & 1 & -1 & -0,6 \\ Cy_{12} & 0,8 & 0,8 & -1 & 1 & 0,7 \\ D_4 & 0,2 & 1 & -0,6 & 0,7 & 1 \end{pmatrix}. \quad (5.11)$$

Aus dieser Korrelationsmatrix können die Korrelation zwischen den einzelnen Komponenten in ihrer Richtung und Stärke entnommen werden. So zeigte sich, dass Dur zu allen anderen Komponenten stark und entgegengesetzt korreliert. Dagegen treten beim ETS zu Par und  $D_4$  nur sehr schwache, gleichgerichtete Korrelationen auf.

## 5.6 Zusammenfassung

Anhand von Modell-Lösungen wurde systematisch die Messunsicherheit der Analyse von Stoffmengengemischen (Stoffmengenverhältnis, -anteil) für mögliche Konstellationen von einzelnen und überlagerten Analytensignale im Spektrum untersucht.

Die Messunsicherheit der Methode bei einzeln zu integrierenden Signalen (einer Fünf-Komponenten-Lösung) wurde mittels eines nationalen und eines internationalen Ringversuches (NMR-2, CCQM-P3) unter Vorgabe der wichtigsten Parameter für Aufnahme, Prozessierung und Auswertung der Spektren in einer Arbeitsanweisung ermittelt. Die Fehleranalyse der Ergebnisse der Ringversuche zeigte, dass die Validierung der wichtigsten Parameter zur Aufnahme und Auswertung des Spektrums nicht ausreichend war, und machte die Ermittlung von weiteren Einflussgrößen notwendig. Folgende Erkenntnisse wurden dabei erzielt:

- Analogfilter geben in der Nähe der Filtergrenze liegende Signale (hier  $D_4$ ) mit einer zu geringen Intensität im Spektrum wieder. Ein Abstand der auszuwertenden Signale von mindestens 10 ppm zu den Filtergrenzen lieferte bei NMR-Spektrometern mit Analogfilter-Technik richtige Analysenergebnisse.
- Der erhebliche Einfluss des Operators auf die Messunsicherheit bei der Korrektur und Auswertung der Spektren konnte mehrfach gezeigt werden. Nachlässige Grundlinien und Phasenkorrekturen, die Nichteinhaltung von konstanten Integrationsfaktoren sowie die nicht-vollständige Erfassung von überlagerten Einzelsignalen führten zu erheblichen Abweichungen der Analysenergebnisse.
- Um den Einfluss des Operators bei der Auswertung zu vermeiden, wurden im Labor vorhandene Korrektur-Algorithmen zur Automatisierung der Spektrenauswertung (XWinNMR und MestRe-C) untersucht. Die dabei verbliebenden Grundlinien- und Phasenfehler führten zu einer höheren Messunsicherheit der Methode.
- Die Auswertung der Spektren mittels simulierter Lorentz-Gauß-Kurven lieferte ebenfalls stark abweichende Analysenergebnisse.
- Ferner kann die Verwendung von nicht speziell für die  $^1\text{H}$ -NMR vorgesehenen Messköpfen zu abweichenden Analysenergebnissen führen.
- Allgemein wurde die Unabhängigkeit der Messunsicherheit der Methoden vom eingesetzten NMR-Spektrometer dargestellt.
- Der Einsatz modernster NMR-Technik (18,8 T, Kryo-Messkopf) führte zu einer besseren Empfindlichkeit, jedoch nicht zu einer besseren Auflösung. Dabei ist mit starken Radiation Damping Effekten zu rechnen, die sich auf die Signalform intensiver Signale im Spektrum (Linienverbreiterung) auswirken.

Zusammenfassend sind daher folgende wichtige Bedingungen zur Aufnahme und Auswertung quantitativer  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektren einzuhalten, um eine geringe Messunsicherheit zu erzielen: Messungen sind nur mit Probenköpfen durchzuführen, die auch für die  $^1\text{H}$ -NMR geeignet sind. Die Zeitsequenz bei der Datenakkumulation sollte mindestens  $7/3$  mal der längsten  $T_1$ -Zeit aller auszuwertenden Signale bei Anregung mit einem  $30^\circ$  Impuls betragen, und die Anzahl der Datenakkumulation sollte ausreichend sein, um für alle auszuwertende Signale ein  $S/N \geq 150$  zu erreichen. Die Filtergrenze ist dabei großzügig zu wählen (30 ppm und mehr stellen heute kein Problem für NMR-Spektrometer dar). Der aufgenommene FID

wird entsprechend durch Zero filling erweitert (um alle Signale mit mindestens fünf Punkten oberhalb der Halbwertsbreite im Spektrum darzustellen) und mit „em (0,3 Hz)“ prozessiert. Die Grundlinien- und Phasenkorrekturen des Spektrums sind manuell und sorgfältig zu handhaben. Ebenso sorgfältig ist die Integration (Auswertung) des Spektrums durch den Operator auszuführen. Neben konstanten Integrationsfaktoren  $\geq 64$  ist bei der Setzung der Integrationsgrenzen auf die vollständige Erfassung aller im Integrationsbereich liegender Signale zu achten. Überlagerte Einzelsignale sind mit einem Integral zu erfassen. Gegebenenfalls ist hierbei der Integrationsbereich zu erweitern. Bei sorgfältiger Korrektur der Grundlinie und Phasen ist eine Korrektur des Integralzuges nicht notwendig. Die Korrektur und Auswertung des Spektrums stellen allgemein hohe Anforderungen an den Operator, die sich nicht objektiv in einer Arbeitsanweisung erfassen lassen.

Bei Einhaltung dieser Arbeitsanweisung wurde die relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) für die beiden hier untersuchten Auswertungsmethoden (Stoffmengenverhältnisse, -anteile) anhand der Teilnehmerergebnisse des nationalen Ringversuchs NMR-2 und eigener Messungen an verschiedenen NMR-Spektrometern zu unter 1,5 % bestimmt. Die hierbei zu analysierende minimale Stoffmengenkonzentration betrug  $0,3 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\text{D}_4$  bei NMR-2).

Die Messunsicherheit ( $k = 2$ ,  $p = 95 \%$ ) der Methode bei Auswertung von Spektren mit überlagerten Signalen wurden nach der obigen Arbeitsanweisung an Modell-Lösungen untersucht.

- Stoffgemische, bei denen sich nicht alle auszuwertenden Signale überlagern (Benzoessäure - Ethylbenzoat), können durch Differenzbildung quantitativ mit einer relativen Messunsicherheit von unter 1,5 % ausgewertet werden.
- Stoffgemischen, deren Signale sich alle überlagern, sich aber im intramolekularen Protonenverhältnis unterscheiden (Ethylbenzoat - Phthalsäurediethylester), können quantitativ mit einem Gleichungssystem analysiert werden. Hierbei wurde eine relative Messunsicherheit der Methode von 2 % ermittelt.
- Lediglich Substanzgemische mit überlagerten Signalen und identischen Protonenverhältnissen zwischen den intramolekularen Signalgruppen (Xylol-Isomere) können mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR nicht quantifiziert werden. Die Trennung der aliphatischen  $\text{CH}_3$ -Signale der Xylole durch Verschiebungsreagenzien ( $\text{Eu}(\text{fod})_3$  und  $\text{Pr}(\text{fod})_3$ ) war für quantitative Analysen nicht ausreichend. Auch die Messung am Höchstfeld-NMR-Gerät (18,8 T) blieb aufgrund der schlechteren Auflösung erfolglos.

Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sind generell auf Stoffsysteme mit ähnlichen Spektrenbildern übertragbar.



## 6 Reinheitsbestimmung

Ein dritter Aufgabenbereich der Analytik ist die Bestimmung der Reinheiten von Substanzen, z.B. zur Zertifizierung von Referenzmaterialien. Publikationen zur Reinheitsanalyse mit der quantitativen NMR belegen z.B. in der Pharmazie [79, 80, 81, 82], in der Agrartechnik [47, 83] und im militärischen Bereich [84] ihre Anwendbarkeit. Allerdings enthalten diese Arbeiten generell keine ausführliche Unsicherheitsbetrachtung und nur in wenigen wurde eine Standardabweichung angegeben. Es sollte daher das vollständige Unsicherheitsbudget aufgestellt und an ausgesuchten, an CCQM-Aufgaben orientierten Systemen die Messunsicherheit des Verfahrens der Reinheitsanalyse mittels NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Die Reinheitsanalyse wurde, wie im Kapitel 3.6.2 beschrieben, über die Hauptkomponentenbestimmung mit Bezug auf einen internen Standard durchgeführt. Um dabei den Anspruch einer relativen primären Methode zu gewährleisten (Rückführung des Analysenergebnisses auf SI-Einheiten), war die Verwendung eines ZRM als Standard bzw. eines auf ein ZRM zurückgeführten Standards notwendig. Hierzu wurde folgendes ZRM des NIST eingesetzt: Benzoesäure (SRM 350a) mit einer Reinheit von  $(99,9958 \pm 0,0027)$  g/g %, deren erweiterte Unsicherheit ein Konfidenzintervall von 95 % bei elf Freiheitsgraden repräsentiert)

### 6.1 Reinheitsbestimmung mit der $^1\text{H}$ -NMR

Die Reinheitsanalyse mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR ist das einfachste Verfahren der NMR-Spektroskopie. Es basiert auf der Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen zwischen Analyt und Standard. Somit sind im Kapitel 5 gewonnenen Erkenntnis hierauf übertragbar.

#### 6.1.1 Maleinsäure

Larive [49] beschreibt Maleinsäure als einen gut für die quantitative  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie geeigneten Standard. Um hierbei die Rückführung der Analysenergebnisse auf die SI-Einheiten bei der Verwendung von Maleinsäure (Merck KG, Reinheit > 99 %) als internem Standard zu gewährleisten, war dessen Reinheit auf das ZRM Benzoesäure zurückzuführen. Mit diesem System sollte gleichzeitig die Messunsicherheit des Verfahrens der Reinheitsanalyse bestimmt werden.

##### 6.1.1.1 Probenpräparation und Spektrenaufnahme

Die allgemeine Probenpräparation zur Reinheitsanalyse besteht aus den Einwaagen des Analyten und des internen Standards derart, dass die Intensitäten der auszuwertenden Signale im Spektrum ungefähr im Verhältnis 1:1 stehen. Daraufhin wird das Einwaagegut in deuteriertem Lösungsmittel gelöst und nach Homogenisierung anschließend ins NMR-Messröhrchen überführt.

Zur quantitativen Analyse der Maleinsäure mit dem ZRM Benzoesäure als internem Standard wurden drei Aliquots eingewogen (Tabelle 6.1) und in Methanol- $d_4$  gelöst. Die Homogenisierung dieser Lösungen erfolgte über Nacht. Anschließend wurden von jedem Aliquot vier Proben entnommen (Überprüfung der Homogenität innerhalb eines Aliquots) und mit den im Kapitel 5 bewährten Standardparametern (Tabelle 5.1, mit  $n_s = 32$ ,  $TD = 64$  k und  $D1 = 30$  s entsprechend der  $T_1$ -Zeiten (Maleinsäure  $< 5$  s, Benzoesäure  $< 3$  s)) gemessen.

Tabelle 6.1: Einwaagen von Maleinsäure und ZRM Benzoesäure zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Maleinsäure.

	Aliquot A	Aliquot B	Aliquot C
$m_{\text{Maleinsäure}}$ in mg	32,21	32,54	32,03
$m_{\text{Benzoesäure}}$ in mg	34,59	34,96	33,24

### 6.1.1.2 Auswertung

Das Spektrum der Lösung, dargestellt in Abbildung 6.1, zeigt bei 6,44 ppm ( $H_2$ ) das olefinische Signal der Maleinsäure sowie bei 7,58 ppm ( $H_2$ ), 7,70 ppm (H) und 8,14 ppm ( $H_2$ ) die drei aromatischen Signale der Benzoesäure.

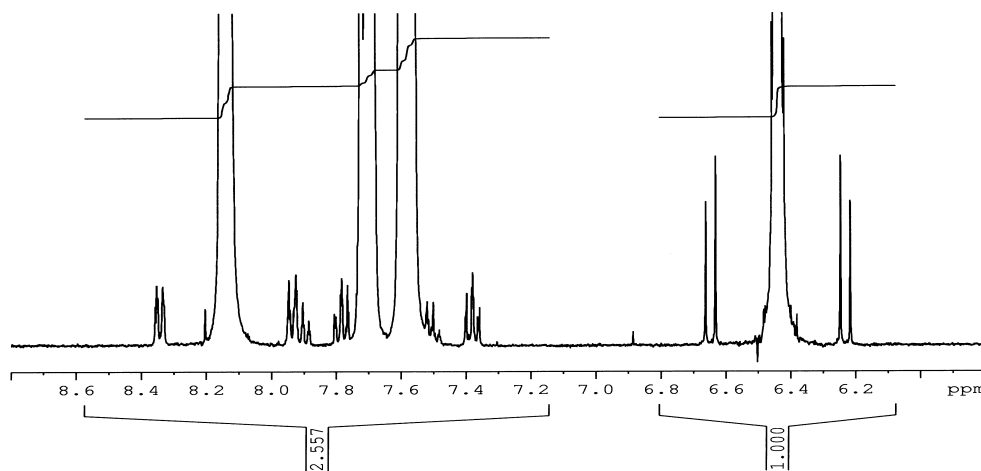


Abbildung 6.1:  $^1H$ -NMR-Spektrum der Lösung Maleinsäure und ZRM Benzoesäure in Methanol- $d_4$ .

Die Signale der beiden Substanzen liegen im Spektrum für eine getrennte Auswertung weit genug auseinander, wobei die drei Signale der Benzoesäure aufgrund der überlagerten  $^{13}C$ -Satelliten mit einem Integral erfasst wurden. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte nach der im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Arbeitsanweisung, jedoch mit einem Integrationsfaktor von 200. Die ermittelten Reinheitsgrade der Maleinsäure der Einzelmessungen, berechnet aus den auf ein Proton normierten Intensitätswerten, Einwaagen und Molmassen der beiden Substanzen ( $M_{\text{Maleinsäure}} = 146,07 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_{\text{Benzoesäure}} = 122,12 \text{ g mol}^{-1}$ )

und dem in der Zertifizierungsurkunde angegebenen Reinheitsgrad des ZRM nach Gleichung (3.13), sind in der Tabelle 6.2 dargestellt.

Tabelle 6.2: Analysenergebnisse der Reinheitsbestimmung von Maleinsäure.

	Reinheitsgrad <i>P</i> in g/g %			
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
Aliquot A	99,79	99,84	99,71	99,91
Aliquot B	99,85	99,85	99,72	99,84
Aliquot C	100,19	100,18	99,95	100,05

Aus diesen zwölf Ergebnissen wurde der Reinheitsgrad der Maleinsäure zu 99,91 g/g % mit einer Standardunsicherheit von  $\pm 0,05$  g/g % ermittelt. Die dabei erreichte geringe relative Standardunsicherheit von 0,05 % war auf das S/N von ca. 12000 und auf die großen Integrationsbereiche zurückzuführen.

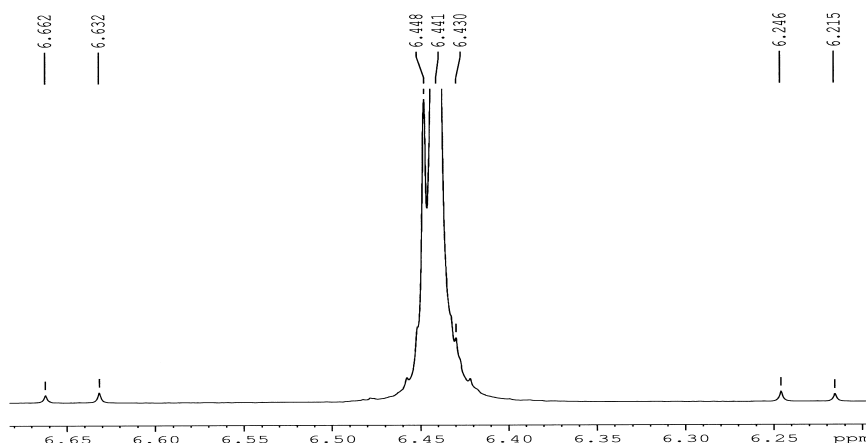


Abbildung 6.2: Teilweise Veresterung der Maleinsäure. Das zusätzliche Signal bei 6,45 ppm stammt von den olefinischen Protonen des Maleinsäureester.

Die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel führte zur partiellen Veresterung beider Substanzen, die sich jedoch nicht signifikant auf die auszuwertenden Protonensignale auswirkte. Das zusätzliche Signal mit geringer Intensität des Maleinsäureesters bei 6,45 ppm – Tieffeld-Verschiebung um 0,01 ppm (Abbildung 6.2) bezüglich der Maleinsäure – und ebenso die Signale des Benzoesäureesters wurden bei der Integration miterfasst und gaben somit die Intensitäten der eingewogenen Stoffmengen beider Substanzen richtig wieder.

### 6.1.1.3 Unsicherheitsbudget

Für das Verfahren der Reinheitsbestimmung sind im Unsicherheitsbudget generell die Unsicherheiten der Intensitätsverhältnisse (Integration), der Molmassen und Einwaagen beider Substanzen und des Reinheitsgrads des Standards zu berücksichtigen.

Die Standardunsicherheit der Integration  $u(I_{Anl}/I_{Std})$  wurde nach Gleichung (4.1) aus den zwölf unabhängigen Messungen zu  $\pm 0,05$  (Typ A) bestimmt. Ferner wurden die Standardunsicherheiten der Molmasse von Maleinsäure ( $C_4H_4O_4$ ) zu  $u(M_{Anl}) = \pm 0,006 \text{ g mol}^{-1}$  und die von Benzoesäure ( $C_7H_6O_2$ ) zu  $u(M_{Std}) = \pm 0,004 \text{ g mol}^{-1}$  nach Gleichung (4.6) aus den Unsicherheiten der Atommassen (entnommen aus IUPAC [85] und in Tabelle 6.3 aufgeführt) ermittelt (Typ B).

Tabelle 6.3: Atommassen und deren Unsicherheiten für H, C und O, entnommen aus IUPAC [85].

Element	Atommasse in $\text{g mol}^{-1}$	Standardunsicherheit in $\text{g mol}^{-1}$
H	1,00794	$\pm 0,00007$
C	12,0107	$\pm 0,0008$
O	15,9994	$\pm 0,0003$

Bei der hier eingesetzten Waage, einer Mettler AT 261 Delta Range, beträgt die Gesamtunsicherheit einer Einwaage  $u(m_{Anl}) = u(m_{Std}) = \pm 0,03 \text{ mg}$  (Tabelle 4.1). Die Unsicherheit des Reinheitsgrades des ZRMs  $u(f_{Std})$  wurde in der Zertifizierungsurkunde mit  $\pm 0,0012 \text{ g/g \%}$  angegeben. Aus diesen Unsicherheitsbeiträgen, aufgelistet in Tabelle 6.4, wurde nach Gleichung (4.12) die kombinierte Standardunsicherheit zu  $\pm 0,14 \text{ g/g \%}$  berechnet.

Tabelle 6.4: Unsicherheitsbeiträge zum Unsicherheitsbudget der Reinheitsbestimmung von Maleinsäure mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektroskopie ( $f_i$ : Freiheitsgrad).

Unsicherheitsbeitrag	$x_i$	$u(x_i)$	$\frac{u(x_i)}{x_i}$	$f_i$
Integration	99,91	0,05	0,05 %	11
Molmasse Benzoesäure	122,121 $\text{g mol}^{-1}$	0,006 $\text{g mol}^{-1}$	0,005 %	50
Molmasse Maleinsäure	116,072 $\text{g mol}^{-1}$	0,004 $\text{g mol}^{-1}$	0,003 %	50
Einwaage Benzoesäure	34,59 mg	0,03 mg	0,09 %	1000
Einwaage Maleinsäure	32,21 mg	0,03 mg	0,09 %	1000
Reinheitsgrad Benzoesäure	99,9958 g/g %	0,0012 g/g %	0,0012 %	11
Komb. Standardunsicherheit $u_c(y)$		0,14 g/g %	0,14 %	549

Die Unsicherheitsbeiträge der Molmassen und ebenso die des Reinheitsgrades vom Standard stellten sich im Vergleich zu denen der Integration und der Einwaage als vernachlässig-

bar gering heraus. Dieses widerspricht der Publikation von Wells [83], bei dem die Unsicherheit des Reinheitsgrades des Standards den größten Beitrag lieferte. Es ist daher bei der Wahl des Standards darauf zu achten, dass sich dessen Unsicherheit nicht bedeutend auf die Gesamtunsicherheit des Ergebnisses auswirkt. Der effektive Freiheitsgrad  $f_{eff}$  von 549 wurde nach der Welch-Satterthwaite-Formel (Gleichung (4.5)) ermittelt. Somit kann ein Konfidenzniveau von  $p = 95\%$  mit einem Erweiterungsfaktor  $k = 2$  geschätzt werden. Infolgedessen betrug nach Gleichung (4.4) die erweiterte Unsicherheit des Analysenergebnisses  $U = \pm 0,27 \text{ g/g } \%$ .

#### 6.1.1.4 Messunsicherheit des Analysenverfahrens

Die im Kapitel 6.1.1.3 berechnete kombinierte Standardunsicherheit berücksichtigt nur die zufälligen Unsicherheiten der Eingangsgrößen und gibt die Unsicherheit des Analysenergebnisses wieder. Um die Messunsicherheit des Analysenverfahrens zu berechnen, ist die Abweichungen des Analysenergebnisses vom Referenzwert zu ermitteln und diese sowie die Unsicherheit des Referenzwertes entsprechend Gleichung 4.17 im Unsicherheitsbudget einzuberechnen. Der Reinheitsgrad der Maleinsäure wurde vom Hersteller mit  $> 99 \text{ g/g } \%$  angegeben. Unter Annahme einer Rechteckverteilung (alle Werte sind gleichwahrscheinlich) ergibt sich somit als Referenzwert ein Reinheitsgrad  $P_{\text{Maleinsäure}} = (99,5 \pm 0,3) \text{ g/g } \%$ , dessen Unsicherheit sich entsprechend Gleichung 4.10 berechnete. Die Fehleranalyse des Verfahrens klassifizierte die Abweichung des Analysenergebnisses als geringfügig (Tabelle 6.5).

Tabelle 6.5: Fehleranalyse und Bestimmung der relativen Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) des Verfahrens der Reinheitsanalyse mit der  $^1\text{H-NMR}$  am Beispiel Maleinsäure mit ZRM Benzoessäure als internem Standard.

$x_{Ref}$ in g/g %	$\bar{x}_i$ in g/g %	$u_c(\bar{x}_i)$ in g/g %	$ \Delta x_i $ in g/g %	$2u(\Delta x_i)$ in g/g %	rel. $U$ in % ( $k = 2$ ; $p = 95\%$ )
$99,5 \pm 0,3$	99,91	0,14	0,4	0,7	1,0

Aus der kombinierten Unsicherheit des Analysenergebnisses, der Abweichung zum Referenzwert und der Unsicherheit des Referenzwertes ergab sich nach Gleichung 4.17 eine relative Messunsicherheit des Verfahrens ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) zu 1 %. Diese wurde hauptsächlich durch die Reinheitsangabe des Herstellers (Referenzwert) beeinflusst.

Da das Analysenergebnis nur von Einwaagen (primäre Methode), Naturkonstanten (Molmassen) und der Reinheit des ZRM abhing, war die Rückführung auf die SI-Einheiten gegeben. Die Maleinsäure konnte von jetzt an für weitere Analysen als ein auf ein ZRM zurückgeführter Standard eingesetzt werden.

### 6.1.2 Referenzmaterialien im pharmazeutischen Bereich

Die Verwendung pflanzlicher Arzneimittel („Phytopharmaka“) ist sowohl national als auch international von großem Interesse. Hierbei ist eine definierte und konstante Zusammensetzung eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Einsatz solcher Phytopharmaka. Die Überprüfung der gleichbleibenden Arzneizusammensetzung ist schwierig, da es sich um komplexe Vielstoffgemische handelt. Hierzu werden pflanzliche Referenzsubstanzen zur Validierung und Kalibrierung der eingesetzten Mess- und Prüfverfahren eingesetzt [86]. Das Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH in Sinzig (ZA-Sinzig) arbeitet u.a. auf dem Gebiet der Herstellung und Zertifizierung von solchen Referenzmaterialien. Die dabei hauptsächlich eingesetzten chromatographischen Methoden zu deren Reinheitsbestimmung können häufig Verunreinigungen mit sehr ähnlichen Strukturen nicht vom Analyten trennen. Die Selektivität der zur Reinheitsbestimmung verwendeten Methode bekommt daher bei Referenzsubstanzen, die aus natürlichen Quellen isoliert werden, eine zentrale Bedeutung. Ein solches hochselektive Verfahren ist die quantitative NMR-Spektroskopie, die zudem schnell ist und eine geringe Probenpräparation erfordert. Obendrein wird durch ihren Charakter einer relativen primären Messmethode [87] die Rückführung der Analysenergebnisse auf die SI-Einheiten garantiert. Es wurde daher mit dieser Arbeit eine Vorstudie zu einem zukünftigen Projekt zur Reinheitsbestimmung von RM mittels NMR-Spektroskopie bearbeitet, deren Reinheiten überwiegend im technischen Bereich liegen sollen.

#### 6.1.2.1 *Analysenverfahren des ZA-Sinzig*

Das ZA-Sinzig setzt zur Reinheitsanalyse mittels NMR-Spektroskopie ein Verfahren mit gleichzeitigem Einsatz eines internen und externen Standards ein [88]. Hierbei werden der Analyt und Etacrynsäure (externer Standard) in je ein NMR-Röhrchen eingewogen und mit exakt einheitlichen Volumina des Lösungsmittels gelöst, welches Dimethylformamid als internen Standard enthält. Man erhält somit zwei Spektren, bei deren Auswertung das Intensitätsverhältnis zwischen dem Analyten und dem externen Standard (Etacrynsäure) über das Referenzieren der beiden Spektren auf die Intensität des internen Standards (Dimethylformamid) verläuft, die in beide Spektren gleich gesetzt wird. Dieses Verfahren weist gegenüber einem einfacheren mit nur einem internen Standard mehr Unsicherheitsbeiträge auf. So sind drei Intensitätsverhältnisse zu berücksichtigen (Analyt/interner Standard(1), interner Standard(1)/interner Standard(2), externer Standard/interner Standard(2)), die zudem untereinander korrelieren. Ferner muss die Unsicherheit des Messvolumens beider NMR-Röhrchen berücksichtigt werden, da herstellungsbedingt die Innendurchmesser der NMR-Röhrchen eine Toleranz von bis zu 1,2 % relativ je nach Qualität aufweisen [89].

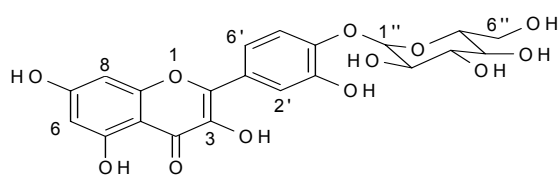
### 6.1.2.2 Erarbeitung eines Analysenverfahrens

Es sollte daher untersucht werden, ob diese Reinheitsanalysen auch mit nur einem internen Standard ausgeführt werden könnten. Zu diesem Zweck wurden drei potentielle Referenzmaterialien (Spiraeosid, Thymol und Loganin) vom ZA-Sinzig bereitgestellt. Für die ersten beiden Substanzen wurde 3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz (TSP) als interner Standard verwendet, beim Loganin das ZRM Benzoesäure.

#### 6.1.2.2.1 Probenpräparation und Spektrenaufnahme

Die Probenpräparation erfolgte analog zu dem im Kapitel 6.1.1.1 vorgestellten allgemeinen Verfahren. Als Lösungsmittel wurde für alle drei Proben deuteriertes Methanol- $d_4$  (vom ZA-Sinzig vorgegeben) verwendet. Die Aufnahmen der Spektren erfolgten mit den Standardparametern aus Kapitel 5.1.2 (Tabelle 5.1, D1 = 60 s (Loganin: D1 = 20 s), ns = 64, TD = 64 k).

#### 6.1.2.2.2 Auswertung: Spiraeosid



Spiraeosid

Abbildung 6.3: Struktur des Spiraeosids. Nummerierung erfolgte nach Vorgaben vom ZA-Sinzig.

Ziel der Reinheitsanalyse vom Spiraeosid (Abbildung 6.3) war das Austesten des Verfahrens. Die Übersichtsspektren zur qualitativen Auswertung – Zuordnung der Signale war zuvor vom ZA-Sinzig geleistet worden – bestätigten eine generelle Stabilität der Substanz. Somit wurden zur quantitativen Auswertung 27,20 mg Spiraeosid ( $M_{\text{Spiraeosid}} = 500,4 \text{ g mol}^{-1}$ ) und 10,40 mg TSP ( $M_{\text{TSP}} = 172,27 \text{ g mol}^{-1}$ ) eingewogen. Das quantitative  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in Abbildung 6.4 gibt die Signallagen des Spiraeosid wieder. Zur Auswertung des Spiraeosids wurden die beiden Signale bei 7,68 ppm (H-6') und 7,74 ppm (H-2') herangezogen. Die Signale bei 6,34 ppm (H-8) und 6,15 ppm (H-6) zeigten Deuterierungserscheinungen, die bei 7,26 ppm (H-5'), 3,94 ppm (H-6''a) und 3,51 ppm (H-2'', H-3'', H-4'', H-5'') wiesen Fremdsignale im Integrationsbereich auf und das Signal bei 3,75 ppm (H-6''b) lag zu nahe bei den benachbarten Signalen.

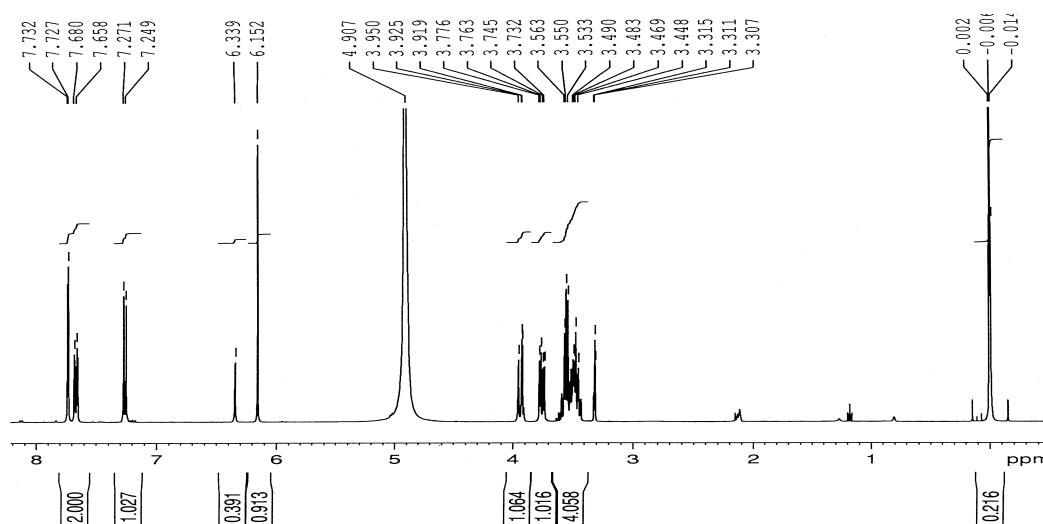


Abbildung 6.4:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum vom Spiraeosid mit TSP (0 ppm) als internem Standard.

Nach Gleichung (3.13) ergibt sich aus den Intensitätswerten des Spiraeosids und des TSP ein Reinheitsgrad von

$$P = \frac{2,000}{10,216} \cdot \frac{9}{2} \cdot \frac{500,4}{172,27} \cdot \frac{10,40}{27,20} \cdot 100\% = 97,8\%, \quad (6.1)$$

wobei  $P_{Std} = 100\%$  angenommen wurde.

#### 6.1.2.2.3 Auswertung: Thymol

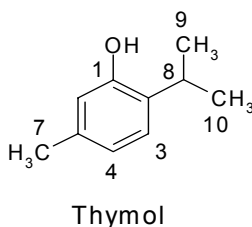


Abbildung 6.5: Struktur des Thymols. Nummerierung erfolgte nach Vorgaben vom ZA-Sinzig.

Ebenso wie beim Spiraeosid war beim Thymol (Abbildung 6.5) vordergründig die Durchführbarkeit der Analyse Gegenstand der Untersuchung und nicht die Ermittlung der Messunsicherheit des Verfahrens. Nachdem die qualitative Zuordnung anhand der Daten vom ZA-Sinzig erfolgt und die Stabilität der Substanz gezeigt war, wurden zur quantitativen Analyse 45,98 mg Thymol ( $M_{\text{Thymol}} = 150,22 \text{ g mol}^{-1}$ ) und 18,35 mg TSP (interner Standard) eingewogen. Zur Auswertung wurden beim Thymol nur die Signale bei 6,96 ppm (H-3) und 6,57 ppm (H-4 und H-6) herangezogen, da die Signale bei 2,20 ppm (H<sub>3</sub>-7) und 3,20 ppm (H-8) Fremdsignale aufwiesen. Das Signal bei 1,17 ppm (H<sub>3</sub>-9 und H<sub>3</sub>-10) wurde als



Kontrolle der Intensitätswiedergabe im Spektrum verwendet, jedoch nicht bei der Auswertung berücksichtigt. Das quantitative Spektrum ist in der Abbildung 6.6 dargestellt.

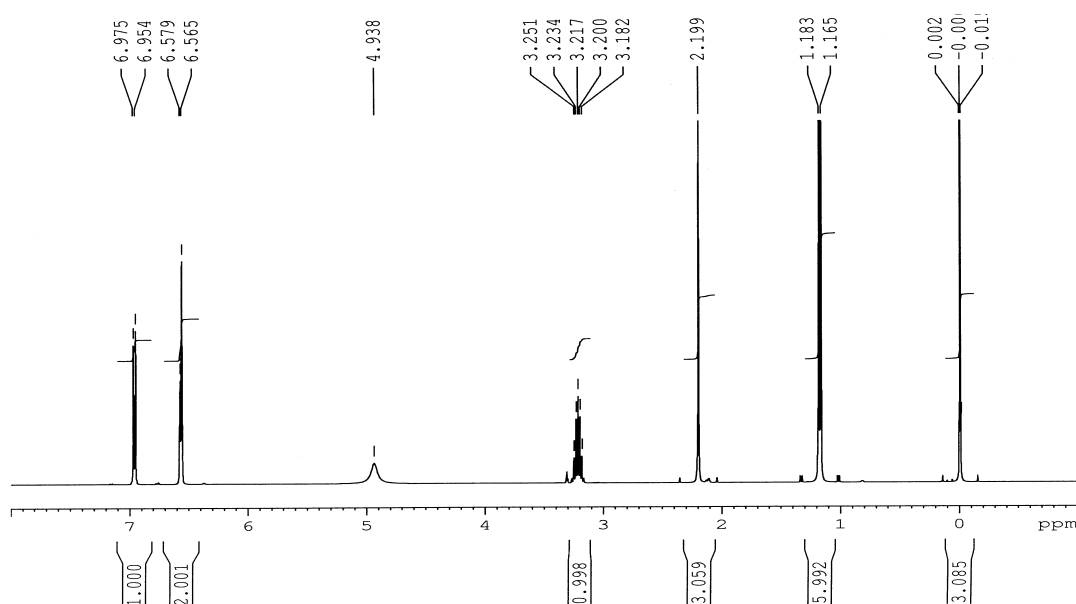


Abbildung 6.6:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum vom Thymol mit TSP (0ppm) als internem Standard.

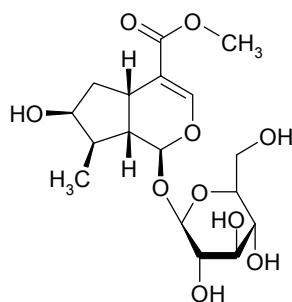
Nach Gleichung (3.13) wurde aus diesen Intensitätswerten ein Reinheitsgrad von

$$P = \frac{1,000 + 2,001}{3,085} \cdot \frac{9}{3} \cdot \frac{150,22}{172,27} \cdot \frac{18,35}{45,98} \cdot 100\% = 101,7\% . \quad (6.2)$$

ermittelt. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine zweite Analyse mit einer Einwaage von 45,05 mg Thymol und 18,74 mg TSP durchgeführt. Der dabei bestimmte Reinheitsgrad von 101,5 % entsprach dem der ersten Messung. Wegen der hygroskopischen Eigenschaft des TSP kann dessen angenommener Reinheitsgrad aber signifikant kleiner sein, so dass die ermittelte Reinheit des Thymols von über 100 % darauf zurückzuführen ist. Für eine genaue Analyse muss daher eine geeignete zertifizierte Lösung von TSP in  $\text{D}_2\text{O}$  als Standard eingesetzt werden.

#### 6.1.2.2.4 Auswertung: Loganin

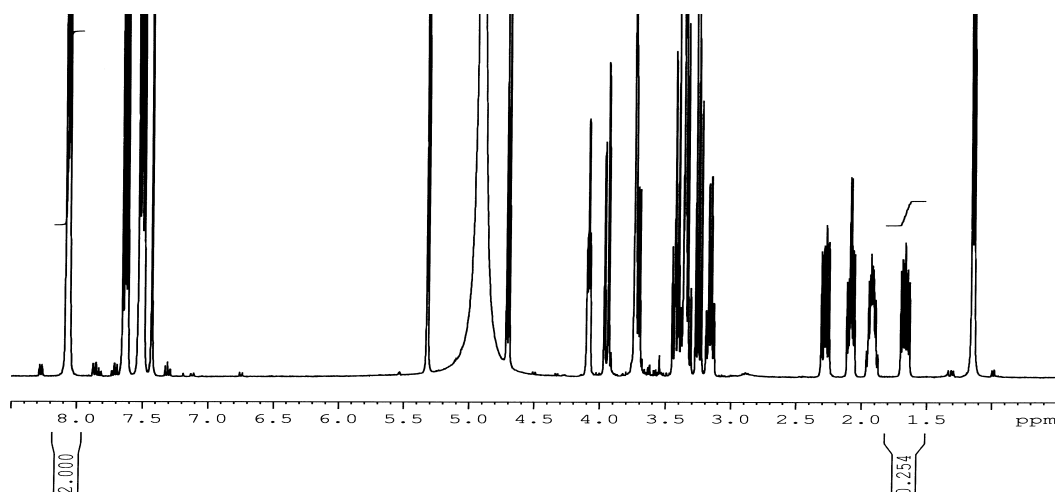
Nachdem die Analysen des Spiraeosids und des Thymols die Durchführbarkeit des Verfahrens der Reinheitsanalyse zeigten, sollte die Reinheitsbestimmung des Loganins (Abbildung 6.7) unter metrologischen Gesichtspunkten mit dem ZRM Benzoesäure als internem Standard erfolgen. Das ZA-Sinzig stellte hierfür zwei Loganin-Proben unterschiedlicher Chargen zur Verfügung. Die qualitative Zuordnung der Signale im Spektrum wurde durch Spektrensimulation mit der Software „ACD HNMR“ getätigt. Von jeder Charge wurde eine Lösung eingewogen (Charge 1056: 9,52 mg Loganin und 10,71 mg ZRM; Charge 48942772: 4,44 mg Loganin und 7,32 mg ZRM) und diese jeweils viermal gemessen.



Loganin

Abbildung 6.7: Struktur des Loganin.

Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte nach der Arbeitsanweisung im Kapitel 5.1.2 mit einem Integrationsfaktor von 64. Von den Signalen des Loganins im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abbildung 6.8) wurde das Signal bei 1,66 ppm als zur Auswertung optimal bewertet. Die übrigen Signale zeigten entweder Fremdsignale oder waren aufgrund der Nähe zu benachbarten Signalen nicht optimal auswertbar. Als Referenzsignal des Standards wurde das Signal bei 8,07 ppm ausgewertet.

Abbildung 6.8:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Loganins mit ZRM Benzoesäure als internem Standard.

Die nach Gleichung (3.13) mit  $M_{\text{Loganin}} = 390,4 \text{ g mol}^{-1}$  berechneten Reinheitsgrade der acht Experimente sind in der Tabelle 6.6 zusammengestellt. Ebenso sind in dieser Tabelle die Schätzwerte der Reinheitsanalyse und deren Standardunsicherheit dargestellt, die mit  $(91,38 \pm 0,09) \text{ g/g } \%$  für Charge 1056 und  $(91,23 \pm 0,15) \text{ g/g } \%$  für Charge 48942772 ähnlich sind.

Tabelle 6.6: Experimentelle Ergebnisse der Reinheitsanalyse der zwei Loganin-Proben sowie deren Schätzwerte und Standardunsicherheiten.

	Reinheitsgrad $P$ in g/g %					$u(x)$
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Schätzwert	
Loganin, Charge: 1056	91,42	91,13	91,49	91,49	91,38	0,17
Loganin, Charge: 48942772	91,12	91,54	90,86	91,39	91,23	0,30

### 6.1.2.3 Unsicherheitsbudget

Bei den Reinheitsanalysen vom Spiraeosid und dem Thymol soll die Betrachtung der kombinierten Standardunsicherheit wegen des unbekannten Reinheitsgrades des Standards (TSP) nicht weiter verfolgt werden, zudem diese hauptsächlich zur Austestung der Durchführbarkeit der Analyse dienten. Nichtsdestoweniger könnte die kombinierte Standardunsicherheit durch Abschätzungen der unbekannten Größen  $u(I_{Anl}/I_{Std})$  und  $u(f_{Std})$  berechnet werden.

Für die Analyse der Reinheit des Loganins war das Unsicherheitsbudget analog zu dem im Kapitel 6.1.1.3 beschriebenen aufzustellen und zu berechnen. Die in die kombinierte Standardunsicherheit eingehenden Unsicherheitsbeiträge sind in der Tabelle 6.7 am Beispiel des Loganin Charge 48942772 zusammengefasst.

Tabelle 6.7: Unsicherheitsbeiträge des Unsicherheitsbudgets zur Reinheitsbestimmung von Loganin Charge 48942772.

Unsicherheitsbeitrag	$x_i$	$u(x_i)$	$\frac{u(x_i)}{\bar{x}_i}$	$f_i$
Integration	91,23	0,15	0,16 %	3
Molmasse Benzoesäure	122,121 g mol <sup>-1</sup>	0,006 g mol <sup>-1</sup>	0,005 %	50
Molmasse Loganin	390,382 g mol <sup>-1</sup>	0,014 g mol <sup>-1</sup>	0,004 %	50
Einwaage Benzoesäure	7,32 mg	0,03 mg	0,4 %	1000
Einwaage Loganin	4,44 mg	0,03 mg	0,7 %	1000
Reinheitsgrad Benzoesäure	99,9958 g/g %	0,0012 g/g %	0,0012 %	11
Komb. Standardunsicherheit $u_c(y)$		0,7 g/g %	0,8 %	846

Für die Charge 48942772 wurde die kombinierte Standardunsicherheit zu  $u_c(y) = \pm 0,7$  g/g % berechnet. Entsprechend ergab sich für die Charge 1056 eine kombinierte Standardunsicherheit von  $u_c(y) = \pm 0,4$  g/g %. Bei beiden übte die Einwaagenunsicherheit aufgrund der geringen Probenmengen den stärksten Einfluss auf die Gesamtunsicherheit aus, gefolgt von der Unsicherheit der Integration. Die Unsicherheiten der Molmassen und des Reinheitsgrades des Standards fielen dagegen vernachlässigbar gering aus, wie die Berechnung

mittels Spreadsheet bestätigte. Die effektiven Freiheitsgrade für beide Chargen wurden zu 846 bzw. 538 bestimmt. Demzufolge ist für die Angabe der erweiterten Unsicherheit ein Erweiterungsfaktor von  $k = 2$  für ein Konfidenzniveau von  $p = 95\%$  anzusetzen.

Insgesamt konnten die Reinheitsgrade der beiden Loganin-Chargen mit der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie unter Berücksichtigung der erweiterten Unsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) zu  $(91,4 \pm 0,8) \text{ g/g } \%$  (Charge 1056) und  $(91,2 \pm 1,4) \text{ g/g } \%$  (Charge 48942772) bestimmt werden.

### 6.1.3 Diskussion und Zusammenfassung

Die Reinheitsbestimmung mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektroskopie wurde über die Hauptkomponentenanalyse untersucht. Mit einem Stoffsystem, bestehend aus Maleinsäure und ZRM Benzoessäure als internem Standard, wurde die Messunsicherheit des Analysenverfahrens ermittelt. Hierzu musste entsprechend der Messgleichung ein Unsicherheitsbudget erstellt werden, dass sich aus den Unsicherheitsbeiträgen der folgenden Eingangsgrößen zusammensetzt: Intensitätsverhältnis (Analyt : Standard), Einwaagen und Molmassen von Analyt und Standard sowie dem Reinheitsgrad des Standards. Anhand von Vergleichsmessungen zeigte sich, dass mit einem besseren S/N ( $\text{S/N} > 10000$ ) und einem größeren Integrationsfaktor von 200 die Unsicherheit des Analysenergebnisses deutlich zu verbessern ist. So wurde hier die erweiterte relative Unsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) zu  $0,3\%$  bestimmt im Vergleich zu  $1,5\%$  bei einem  $\text{S/N} > 150$  und einem Integrationsfaktor von 64. Die relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) des Verfahrens wurde durch Bezug auf die Reinheitsangabe des Herstellers zu  $1\%$  ermittelt, wobei die Abweichung des Analysenergebnisses sich als geringfügig darstellte. Die ungenaue Angabe des Reinheitsgrades von  $> 99\%$  führte zu dieser gegenüber der Unsicherheit des Analysenergebnisses erhöhten Messunsicherheit des Verfahrens. Einen genaueren Referenzwert von anderen anerkannten analytischen Methoden (HPLC, GC, MS) zu erhalten, scheiterte an der Unkenntnis der möglichen Verunreinigungen. Hier drin besteht der wesentliche Vorteil der NMR-Spektroskopie. Aufgrund der ausgezeichneten selektiven und spezifischen Eigenschaften können die Resonanzlinien detektierbarer Verunreinigungen generell von denen der Hauptkomponente im Spektrum unterschieden werden. Dazu kommt die Analyse über die Hauptkomponente, bei der nur der Analyt selber, nicht aber die Verunreinigungen zum Ergebnis beitragen. Die Analyse von Reinstsubstanzen mit einem Reinheitsgrad von  $99,9 \text{ g/g } \%$  und mehr ist dagegen mit diesem Verfahren wegen der ermittelten Messunsicherheiten des Analysenergebnisses als auch des Verfahrens nicht machbar. Hierzu könnte die Reinheitsbestimmung über die Verunreinigungen mit der  $^1\text{H}$ -NMR eingesetzt werden, bei der alle Verunreinigungen zu qualifizieren und quantifizieren sind. Dieses war jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit. Als interessante Anwendungsgebiete kommen Reinstsubstanzen mit Reinheiten im technischen Bereich in Frage. Genau aus diesem Grunde wurde im Rahmen einer Vorstudie die quantitative  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie mit der Hauptkomponentenanalyse als Verfahren zur Reinheitsanalyse von Referenzmaterialien für die Pharmazie ausgetestet.

Hierzu wurden vom ZA-Sinzig drei Substanzen (Spiraeosid, Thymol, Loganin) zur Verfügung gestellten. Als wichtige Grundlage für die quantitative Auswertung sind die Stabilität des Analyten zu zeigen und die Signale eindeutig qualitativ zuzuordnen. Verunreinigungen wurden in den Spektren erkannt, nicht aber qualitativ zugeordnet (Bestandteil des zukünftigen Projekts). Bei der Betrachtung der Spektren zeigte sich, dass die auszuwertenden Signale genau auszuwählen sind, um systematische Fehler zu vermeiden. Signale, die der zeitlichen Deuterierung unterliegen, die Fremdsignale im Integrationsbereich enthalten oder die mit einem Integrationsfaktor von mindestens 64 nicht ausgewertet werden können, dürfen zur Auswertung nicht herangezogen werden. Am Loganin wurde mit dem ZRM Benzoessäure die Messunsicherheit des Analysenverfahrens ausgetestet. Die Spektren wurden mit der im Kapitel 5 bewährten Arbeitsanweisung aufgenommen und ausgewertet. Die ermittelte relative Messunsicherheit des Verfahrens ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) von 0,9 % bzw. 1,5 % beruhte auf der kombinierten Standardunsicherheit der Eingangsgrößen. Dabei sind im Unsicherheitsbudget die Unsicherheitsbeiträge der beiden Einwaagen und der Integration (Auswertung) dominant, während die Unsicherheiten der Molmassen und des Reinheitsgrades dagegen vernachlässigbar gering ausfallen. Die erhöhte relative Messunsicherheit von 1,5 % ist auf die geringe zur Verfügung gestellte Substanzmenge des Analyten zurückzuführen. Die Berücksichtigung systematischer Abweichung bezogen auf Referenzwerte soll erst im zukünftigen Projekt erfolgen.

## 6.2 Reinheitsbestimmung mit der $^{13}\text{C}$ -NMR

Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Isotops ist bei der  $^{13}\text{C}$ -NMR im Vergleich zur  $^1\text{H}$ -NMR mit konzentrierten Lösungen und einem größeren Zeitaufwand zu messen. Nichtsdestoweniger gehört in der organischen Chemie die  $^{13}\text{C}$ -NMR zu den meist angewendeten NMR-Methoden.

### 6.2.1 Xylole (Vorbereitung CCQM-P20b)

In Anbetracht des vom CCQM geplanten internationalen Ringversuchs CCQM-P20b zur Reinheitsanalyse eines Xylol-Isomeren wurden Voruntersuchungen zur Analyse mit der NMR-Spektroskopie durchgeführt. Wie im Kapitel 5.4.3 gezeigt wurde, war mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR dieses quantitative Problem nicht lösbar. Daher sollten die Möglichkeiten der  $^{13}\text{C}$ -NMR mit Durol als internem Standard untersucht und die Messunsicherheit des Verfahrens der Reinheitsbestimmung mit der quantitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR ermittelt werden.

#### 6.2.1.1 Probenpräparation und Spektrenaufnahme

Für die Reinheitsanalyse der drei Xylol-Isomeren und zusätzlich des ETB wurde eine Lösung mit Durol als internem Standard so eingewogen, dass alle auszuwertenden Signale in einem Intensitätsverhältnis von ungefähr 1 : 1 standen. Damit wurden die Analysenbedingungen

wegen der ähnlichen Signalintensitäten zwischen Analyt und den in dieser Arbeit betrachteten Verunreinigungen gegenüber jeder möglichen realen Probe erschwert. Ferner konnte anhand einer Modell-Lösung die Reinheitsbestimmung der vier Isomere gleichzeitig durchgeführt werden, wenn bei der Auswertung nur die Einwaagen des zu bestimmenden Analyten und des Standards berücksichtigt wurden.

Die Einwaagen von 104,9 mg o-Xylol, 171,5 mg m-Xylol, 119,5 mg p-Xylol und 209,1 mg ETB erfolgten direkt in ein 10 mm NMR-Messröhrchen. Dazu wurden 67,8 mg Durol als interner Standard eingewogen und 2 ml deuteriertes Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) zur geringfügigen Verdünnung (konzentrierte Lösung) zugegeben. Zur Aufnahme quantitativer  $^1\text{H}$ -entkoppelter  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren war die im Kapitel 3.3.2 beschriebene „Inverse Gated decoupling“ Technik (Pulsprogramm „zgig“) verwendet worden. Da es sich hierbei um eine MP-Sequenz handelte, waren die Standardparameter der SP-Technik (Tabelle 5.1) nicht mehr generell übertragbar. Um NOE-Effekte zu vermeiden, wurde die Aufnahmezeit  $t_{\text{Acq}}$  – entspricht der Einstrahldauer des Entkoppler-Impulses – auf 2,8 s begrenzt. Messungen mit längeren Aufnahmezeiten ( $t_{\text{Acq}} = 6 \text{ s}$ ) führten zu Intensitätsverfälschungen im Spektrum, verursacht durch NOE-Effekte. Entsprechend der längsten  $T_1$ -Zeit von 21 s wurde  $\text{D1} = 180 \text{ s} > 7 \times 21 \text{ s}$  gesetzt, womit der Bedingung zum vollständigen Abbau evtl. aufgebauter NOE-Effekte ebenfalls nachgekommen wurde. Die Spektrenaufnahmen (fünf Messungen) erfolgten am 10mm HR-Messkopf. Die Akkumulation von 256 Scans führten zu einem S/N von 650.

#### 6.2.1.2 Auswertung

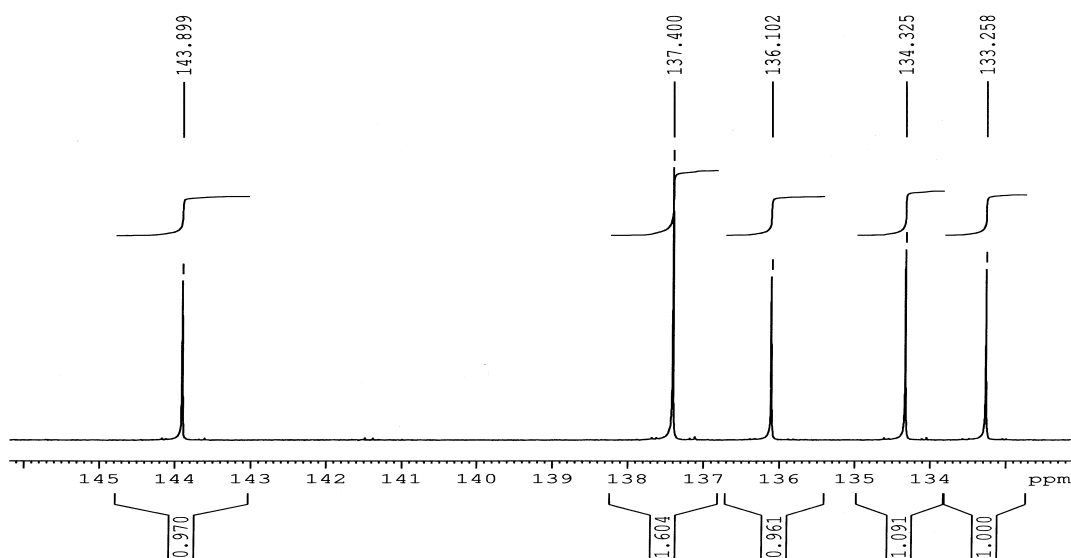


Abbildung 6.9:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der quartären C-Atome der Xylol-Lösung. 143,9 ppm ETB; 137,4 ppm m-Xylol; 136,1 ppm o-Xylol; 134,3 ppm p-Xylol und 133,3 ppm Durol (interner Standard) in  $\text{CDCl}_3$ .

Die Prozessierung und Korrekturen der Spektren erfolgten nach der im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Arbeitsanweisung. Für die Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums eigneten sich angesichts der großen Signalabstände die quartären C-Atom-Signale bei 144 ppm (ETB, C), 137 ppm (m-Xylol, C<sub>2</sub>), 136 ppm (o-Xylol, C<sub>2</sub>), 134 ppm (p-Xylol, C<sub>2</sub>) und 133 ppm (Durol, C<sub>4</sub>), wie in der Abbildung 6.9 gezeigt. Zur Berechnung des Reinheitsgrades eines Xylol-Isomeren wurde die Anwesenheit der anderen drei Isomere nicht berücksichtigt. In die Gleichung (3.13) gingen somit nur die Einwaagen des Standards und des zu bestimmenden Analyten ein. Der Reinheitsgrad des Standards (Durol) wurde laborintern auf das ZRM Benzoessäure zurückgeführt und zu  $(99,59 \pm 0,12)$  g/g % bestimmt. Die Ergebnisse der fünf Messungen, der daraus berechneten Schätzwerte und deren Standardunsicherheiten sind in Tabelle 6.8 aufgelistet.

Tabelle 6.8: Analysenergebnisse der Reinheitsbestimmungen von Xylole und ETB mit Durol als internem Standard.

	Reinheitsgrad $P$ in g/g %						$u(x)$
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Schätzwert	
o-Xylol	99,3	97,9	99,9	99,0	99,3	99,1	0,4
m-Xylol	100,7	99,9	99,9	100,0	100,5	100,2	0,2
p-Xylol	99,2	97,5	100,1	98,5	99,8	99,1	0,5
ETB	101,3	99,1	98,6	96,6	100,4	99,2	0,8

Das Aufstellen des Unsicherheitsbudgets und die Berechnungen der erweiterten Unsicherheiten erfolgten analog zu dem im Kapitel 6.1.1.3 beschriebenen Verfahren. Die Einwaagen erfolgten auf der Sartorius BP121S mit einer Einwaageunsicherheit von  $u(m) = \pm 0,2$  mg (Tabelle 4.1). In Tabelle 6.9 sind die berechneten kombinierten und erweiterten Unsicherheiten bei Betrachtung eines 95%igen Konfidenzintervalls sowie die effektiven Freiheitsgrade (berechnet nach Gleichung 4.5) dargelegt. Die in dieser Tabelle aufgeführten Erweiterungsfaktoren wurden für effektive Freiheitsgrade  $f_{\text{eff}} < 10$  dem GUM [11] entnommen. Andernfalls wurde ein Konfidenzniveau von 95 % mit  $k = 2$  geschätzt.

Tabelle 6.9: Kombinierte und erweiterte Unsicherheit bei einem 95%igen Konfidenzintervall der Reinheitsanalyse von Xylole und ETB.

	$u_c(y)$	$f_{\text{eff}}$	$k$ ( $p = 95 \%$ )	$U$
o-Xylol	$\pm 0,5$ g/g %	7	2,4	$\pm 1,2$ g/g %
m-Xylol	$\pm 0,3$ g/g %	12	2	$\pm 0,6$ g/g %
p-Xylol	$\pm 0,6$ g/g %	6	2,5	$\pm 1,5$ g/g %
ETB	$\pm 0,8$ g/g %	5	2,8	$\pm 2,2$ g/g %

### 6.2.1.3 Messunsicherheit des Analysenverfahrens

Um den Einfluss systematischer Abweichungen zu ermitteln, wurden die Analysenergebnisse mit den Reinheitsangaben des Herstellers (Reinheit > 99 %) verglichen. Entsprechend der im Kapitel 6.1.1.4 beschriebenen Vorgehensweise zur Festlegung des Referenzwertes (Rechteckverteilung) ergaben sich als Referenzwerte für alle vier Komponenten Reinheitsgrade von  $(99,5 \pm 0,3)$  g/g %. Die Abweichungen der Analysenergebnisse von den Referenzwerten wurden bei der Fehleranalyse durchgängig als geringfügig eingestuft. Die relative Messunsicherheit des Verfahrens ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) wurde zu unter 2 % bestimmt.

Tabelle 6.10: Fehleranalyse und Bestimmung der relativen Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) des Verfahrens der Reinheitsanalyse mit der  $^{13}\text{C}$ -NMR am Beispiel der Xylole mit Durol als auf ZRM Benzoesäure zurückgeführten internen Standard.

Komponente	$x_{\text{Ref}}$ in g/g %	$\bar{x}_i$ in g/g %	$u_c(\bar{x}_i)$ in g/g %	$ \Delta x_i $ in g/g %	$2u(\Delta x_i)$ in g/g %	rel. $U$ in % ( $k=2$ ; $p=95\%$ )
o-Xylol	$99,5 \pm 0,3$	99,1	0,5	0,4	1,0	1,3
m-Xylol	$99,5 \pm 0,3$	100,2	0,3	0,7	0,7	1,5
p-Xylol	$99,5 \pm 0,3$	99,1	0,6	0,4	1,2	1,5
ETS	$99,5 \pm 0,3$	99,2	0,8	0,3	1,6	1,7

### 6.2.2 Internationaler Ringversuch CCQM-P20a

Nachdem im Kapitel 6.2.1 ein Messverfahren erarbeitet und die Messunsicherheit des Verfahrens laborintern bestimmt wurde, sollte mit der Teilnahme an einem internationalen Ringversuch des CCQMs ein Vergleich mit anderen Methoden erfolgen. Das Ziel des Pilot-Ringversuches CCQM-P20a, organisiert vom NARL, war die Reinheitsbestimmung von Tri( $n$ butyl)zinnchlorid (TBT-Cl), das u.a. Isomere und Homologe als Verunreinigungen enthielt. Voruntersuchungen vom NARL [90] mit der 1D-NMR-Spektroskopie zeigten, dass die  $^1\text{H}$ -NMR aufgrund überlagerter Signale sowie eines komplexen Spektrums (homonukleare Kopplungen von  $^1\text{H}$  mit  $^1\text{H}$  und heteronukleare von  $^1\text{H}$  mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{115,117,119}\text{Sn}$ ) diese Aufgabenstellung nicht bewältigen kann. Ferner ist die  $^{119}\text{Sn}$ -NMR wegen fehlender geeigneter interner Standards, keiner homogenen Anregung über die gesamte Spektrenweite, Liganden-Austausch und breiter Signale (erschwert die Identifizierung von geringen Verunreinigungen) nicht einsetzbar. Die Reinheitsanalyse mit der  $^1\text{H}$ -entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR ist hingegen ein einsetzbares, hierfür noch nicht weiter untersuchtes Verfahren. Es wurde daher versucht, mit der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Technik an diesem CCQM-Ringversuch teilnehmend dieses Problem zu lösen. Als interner Standard wurde das ZRM Benzoesäure eingesetzt.



### 6.2.2.1 Probenpräparation und Spektrenaufnahme

Zur quantitativen Auswertung wurden zwei Aliquots (A: 120,8 mg TBT-Cl und 228,9 mg ZRM; B: 122,0 mg TBT-Cl und 205,0 mg ZRM) eingewogen und in einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus DMSO- $d_6$  und  $CDCl_3$  im Verhältnis 1:1, gelöst und verdünnt. Die  $^1H$ -entkoppelten  $^{13}C$ -Spektren wurden am QNP-Messkopf mit der „Inverse Gated decoupling“-Technik unter Setzung der Entkopplungszeit auf  $t_{Aq} = 3$  s (zur Minimierung der NOE-Entwicklung) und demzufolge einem Relaxationsdelay von  $D1 = 150$  s ( $> 7 \times T_1$ ) aufgenommen. Die  $T_1$ -Relaxationszeiten wurden für die Signale der Benzoesäure zu  $< 10$  s und für die des TBT-Cl zu  $< 6$  s bestimmt. Insgesamt wurden nach Ringversuchsanweisung vier Messungen pro Aliquot ausgeführt. Die Akkumulation von 128 Scans (entspricht einer Gesamtaufnahmezeit von 6h pro Spektrum) führte zu einem ausreichendem S/N von 200.

### 6.2.2.2 Auswertung

Gemäß der im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Arbeitsanweisung wurden die Spektren prozessiert, korrigiert und integriert. Das in der Abbildung 6.10 gezeigte  $^1H$ -entkoppelte  $^{13}C$ -Spektrum gibt bei 12 ppm, 19 ppm, 25 ppm und 27 ppm die vier Signale des TBT-Cl und bei 127 ppm, 129 ppm, 130 ppm, 132 ppm und 167 ppm die fünf Signale der Benzoesäure wieder.

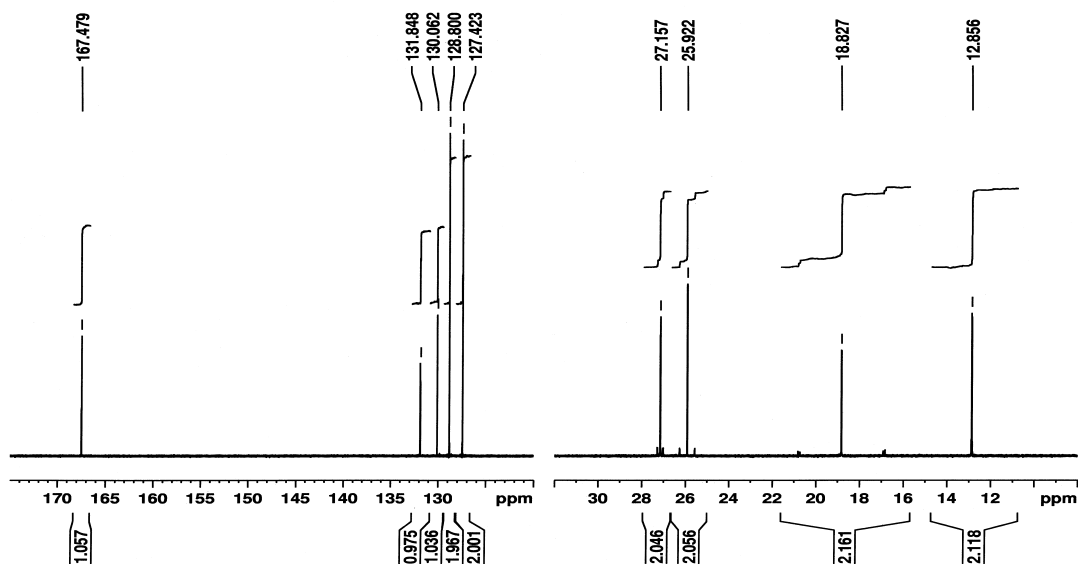


Abbildung 6.10: Internationaler Ringversuch CCQM-P20a. Messung mit dem QNP-Messkopf. Ausschnitte des  $^{13}C$ -NMR-Spektrums: Benzoesäure-Signale im aromatischen Bereich; TBT-Cl-Signale im aliphatischen Bereich.

Diese Signale wurden jeweils einzeln integriert, wobei die Sn-Satelliten der TBT-Cl-Signale miterfasst wurden, nicht aber im Spektrum erkennbare Signale von Verunreinigungen. Die Einhaltung eines konstanten Integrationsfaktors war daher nicht möglich. Auffällig waren bei

allen acht Spektren die vom natürlichen Verhältnis um bis zu 6 % relativ abweichenden, im Spektrum wiedergegebenen intramolekularen Intensitätsverhältnisse, besonders bei der Benzoesäure, wie in der Abbildung 6.10 erkennbar. Zur Berechnung der Reinheit vom TBT-Cl wurden die Summe der fünf Intensitätswerte der Benzoesäure und die Summe der vier Intensitätswerte des TBT-Cl in Gleichung (3.13) eingesetzt. Diese so berechneten, in Tabelle 6.11 aufgelisteten acht Analysenergebnisse gaben die Reinheit des TBT-Cl mit einem Schätzwert von 97,4 g/g % und einer Standardunsicherheit von  $\pm 0,4$  g/g % wieder.

Tabelle 6.11: Internationaler Ringversuch CCQM-P20a. Analysenergebnisse der Reinheitsanalyse vom TBT-Cl.

	Reinheitsgrad $P$ in g/g %				Schätzwert
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
Aliquot A	98,5	97,2	98,1	97,7	97,9
Aliquot B	98,4	96,3	95,6	97,6	97,0

Im Gegensatz dazu streuen die aus jeder möglichen Kombination je eines Signals pro Substanz berechneten und in Matrizen dargestellten Reinheitsgrade innerhalb eines Spektrums bis zu 5 % relativ (Gleichung 4.7). Die Tabelle 6.12 gibt beispielhaft die Matrix des Spektrums in der Abbildung 6.10 wieder.

Tabelle 6.12: Matrix der aus je einem Signal pro Substanz berechneten Reinheitsgrade. Die Standardunsicherheit (Gleichung 4.7) innerhalb dieser Matrix beträgt 4 % relativ.

	127 ppm	129 ppm	130 ppm	132 ppm	167 ppm
12 ppm	93,9 g/g %	101,8 g/g %	95,9 g/g %	100,9 g/g %	99,3 g/g %
19 ppm	95,9 g/g %	103,9 g/g %	97,8 g/g %	103,0 g/g %	101,3 g/g %
25 ppm	91,2 g/g %	98,9 g/g %	93,0 g/g %	98,0 g/g %	96,3 g/g %
27 ppm	90,8 g/g %	98,4 g/g %	92,6 g/g %	97,5 g/g %	95,9 g/g %

Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde eine Messung am 10mm HR-Messkopf mit einer größeren Einwaage (542,4mg TBT-Cl und 232,2mg ZRM Benzoesäure in 2ml DMSO- $d_6$  +  $CDCl_3$  (1:1) gelöst) und einer längeren Messzeit von 66h ausgeführt. Das hierbei erreichte S/N von 550 gab die Signale der Verunreinigungen im Spektrum gut erkennbar wieder; im Integrationsbereich liegende Fremdsignale waren von geringer Intensität. Die Auswertung ergab hier einen mit dem QNP-Messkopf vergleichbaren Reinheitsgrad von 97,4%. Jedoch wichen auch hier die integrierten Intensitätsverhältnisse der Benzoesäure-Signale vom natürlichen Verhältnis um bis zu 5 % relativ ab. Ursache hierfür war der geringe Abstand zwischen den Signalen, wodurch die Signale nicht die Grundlinie erreichen, wie in der Abbildung 6.11 dargestellt.

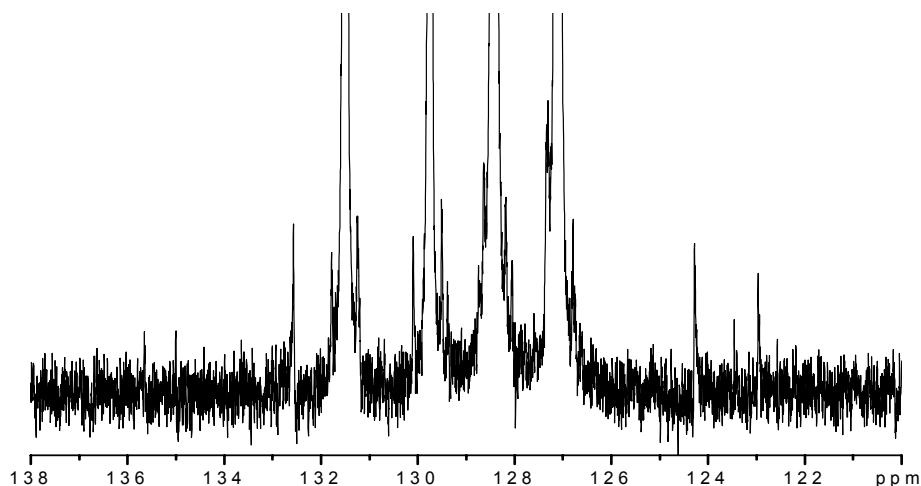


Abbildung 6.11:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der aromatischen Signale der Benzoesäure. Zwischen den Signalen wird die Grundlinie nicht erreicht.

Der dabei auftretende Fehler der Intensitätswiedergabe bei der Korrektur des Integralzuges zu geraden An- und Ausläufen wurde bereits in Kapitel 5.3.2 beschrieben. Daraufhin wurde eine zweite Auswertungsart untersucht. Entsprechend der aufgestellten Forderung zur Auswertung teilweiser überlagerter Einzelsignale (Kapitel 5.3.2) wurden diese vier Signale mit einem einzigen Integralzug erfasst, dargestellt in Abbildung 6.12.

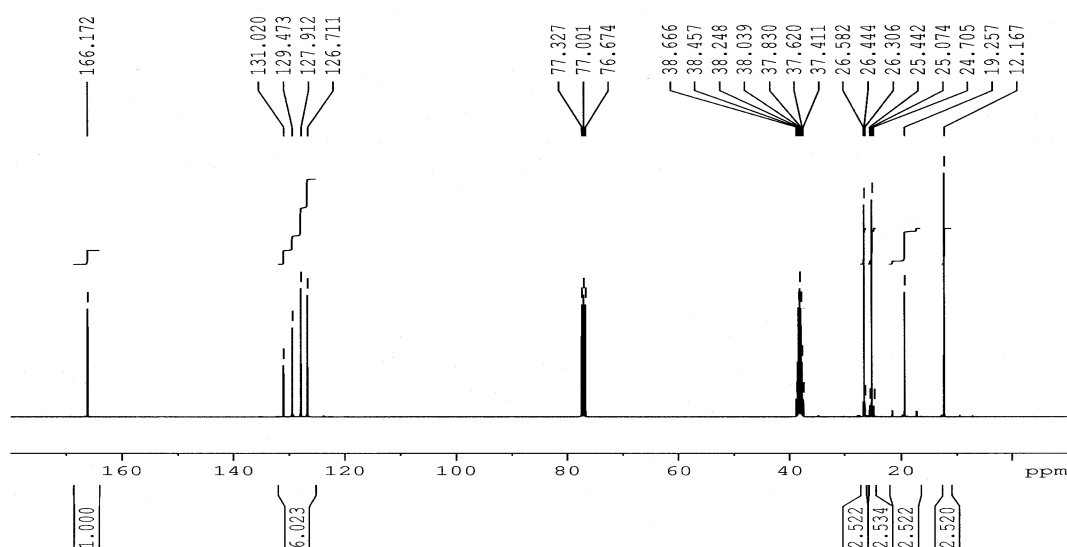


Abbildung 6.12:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum. Erfassung der aromatischen C-Signale der Benzoesäure mit einem Integral.

Das dabei erhaltende Verhältnis der Intensitätswerte dieses Integrals zu dem des Signals bei 166ppm war dem natürlichen Verhältnis von 6:1 sehr nahe. Der berechnete Reinheitsgrad aus diesen Integralwerten ergab 95,8 %, einen um ca. 2 % relativ kleineren Wert als bei der vorherigen Auswertungsart. Dementsprechend wurden bei den acht Spektren des Ringversuchs am QNP-Messkopf die vier Einzelintegrale der aromatischen Benzoesäure-

Signale durch einen Integralzug ersetzt und der Reinheitsgrad neu berechnet. Als Analysenergebnis aus dieser Auswertung wurde der Reinheitsgrad des TBT-Cl zu 95,8 % mit einer Standardabweichung von 1,5 % bestimmt.

Zur Überprüfung, ob bei dieser Entkopplungsdauer signifikante NOE-Effekte auftraten, wurden Messungen mit einer kürzeren Aufnahmezeit ( $t_{\text{Ac}}=1,5$  s) sowie mit einem Relaxationsreagenz ( $\text{Cr}(\text{acac})_3$ ) durchgeführt, die vergleichbare Resultate lieferten. Damit konnte gezeigt werden, dass bei einer Entkopplungsdauer von 3 s die Intensitäten im Spektrum richtig wiedergegeben werden.

### 6.2.2.3 Unsicherheitsbudget

Das hier zu betrachtende Unsicherheitsbudget entspricht dem im Kapitel 6.1.1.3 aufgeführten, wobei die Einwaagen auf der Sartorius BP121S-Waage durchgeführt wurden, deren Einwaageunsicherheit nach Kapitel 6.2.1.2  $u(m) = \pm 0,2$  mg beträgt. Die darin eingehenden Unsicherheitsbeiträge sind in der Tabelle 6.13 für die Auswertung der acht Ringversuchsmessungen mit der Integration aller Einzelsignale aufgeführt.

Tabelle 6.13: Unsicherheitsbeiträge zum Unsicherheitsbudget der Reinheitsbestimmung des TBT-Cl.

Unsicherheitsbeitrag	$x_i$	$u(x_i)$	$\frac{u(x_i)}{\bar{x}_i}$	$f_i$
Integration	97,4	0,4	0,4 %	7
Molmasse Benzoesäure	122,121 g mol <sup>-1</sup>	0,006 g mol <sup>-1</sup>	0,005 %	50
Molmasse TBT-Cl	325,49 g mol <sup>-1</sup>	0,012 g mol <sup>-1</sup>	0,004 %	50
Einwaage Benzoesäure	120,8 mg	0,2 mg	0,16 %	1000
Einwaage TBT-Cl	228,9mg	0,2 mg	0,09 %	1000
Reinheitsgrad Benzoesäure	99,9958 g/g %	0,0012 g/g %	0,0012 %	11
Komb. Standardunsicherheit $u_c(y)$		0,4 g/g %	0,4 %	7

Hieraus ergab sich eine hauptsächlich durch die Unsicherheit der Integration beeinflusste kombinierte Unsicherheit von  $\pm 0,4$  g/g %. Als erweiterte Unsicherheit konnte bei einem 95%igen Konfidenzintervall mit einem  $k$ -Faktor von 2,4 (entspricht  $f_{\text{eff}} = 7$ ) ein Wert von  $\pm 1,0$  g/g % ermittelt werden. Analog dazu wurde bei der zweiten vorgestellten Auswertungsmethode der Reinheitsgrad des TBT-Cl zu  $(95,8 \pm 1,3)$  g/g % ( $k = 2,36$ ;  $p = 95$  %) korrigiert.

#### 6.2.2.4 Ergebnisse des Ringversuches CCQM-P20a

Innerhalb des Bearbeitungszeitraumes für den Ringversuch wurde das Ergebnis der Reinheitsanalyse mit Einzelintegration der Benzoesäure-Signale abgegeben. Nach Abschluss des Ringversuches, aber noch vor Bekanntgabe der Ergebnisse, wurde das korrigierte Analysenergebnis dem Veranstalter mitgeteilt.

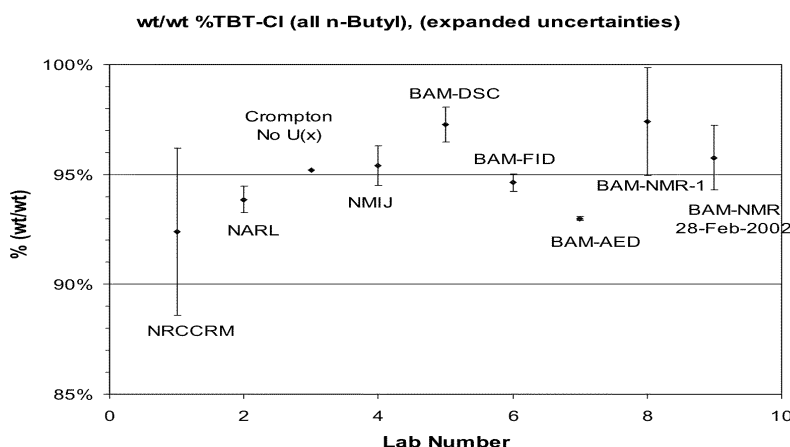


Abbildung 6.13: Internationaler Ringversuch CCQM-P20a. Analysenergebnisse der Teilnehmer zur Reinheitsbestimmung des TBT-Cl (entnommen aus [91]).

Aus der vom Veranstalter ausgefertigten Darstellung der Ringergebnisse in Abbildung 6.13 ist zu erkennen, dass das korrigierte Analysenergebnis (BAM-NMR 28-Feb-2002) recht gut mit denen der anderen Methoden und anderer Institute übereinstimmt.

#### 6.2.2.5 Messung am 800 MHz-Spektrometer

Bei Messungen bei der Firma Bruker sollte an einem Höchstfeld-NMR-Spektrometer (18,8T; 800 MHz) untersucht werden, ob bei höherem Feld eine Verbesserung der Auswertung mit der  $^{13}\text{C}$ -NMR und der  $^1\text{H}$ -NMR möglich ist. Aufgrund der schlechteren Auflösung (breitere Linien) wurde der Vorteil der doppelten Messfrequenz kompensiert, wie auch schon im Kapitel 5.3.4 diskutiert. Jedoch führt die bei weitem höhere Empfindlichkeit zu einer kürzeren Messzeit. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum am 800 MHz Spektrometer aufgenommen zeigt in der Abbildung 6.14 die gut voneinander getrennten Protonen-Signale des TBT-Cl. Eine quantitative Auswertung zur Reinheitsbestimmung war aufgrund der auf den Flanken der Hauptsignale liegenden Protonensignale der Verunreinigungen nicht möglich.

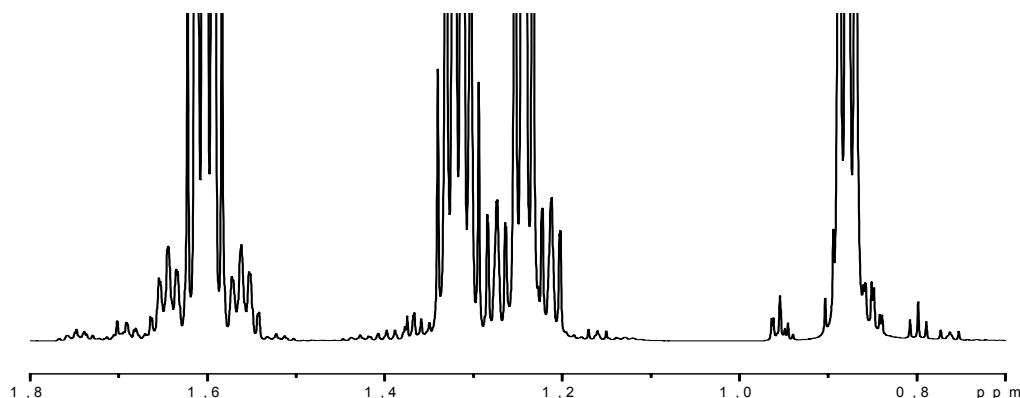


Abbildung 6.14:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des TBT-Cl an einem 800 MHz Spektrometer.

### 6.2.3 Diskussion und Zusammenfassung

An Stoffsystemen, die mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR nicht quantitativ auswertbar sind (Xylol-Isomere, TBT-Cl), wurde der Einsatz der quantitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR ausgetestet. Zur Vereinfachung der Spektren wurde hierzu die  $^1\text{H}$ -entkoppelte-BB- $^{13}\text{C}$ -NMR-Technik verwendet, bei der es sich jedoch um eine MP-Methode handelt. Demzufolge musste die Aufnahmezeit, während der entkoppelt wird, optimiert werden, um Intensitätsveränderungen durch NOE-Effekte zu vermeiden. Eine Aufnahmezeit von 3 s zeigte im Vergleich zu einer kürzeren Aufnahmezeit von 1,5 s (kürzere Einstrahldauer der Entkopplerleistung) sowie zum Einsatz von Relaxationsreagenzien keinen Einfluss auf die Intensitäten im Spektrum, während eine längere Aufnahmezeit von 6 s die Intensitäten signifikant verfälschte.

Am System der Xylol-Reinheitsbestimmung bei gleichzeitiger Anwesenheit der beiden anderen Stereoisomeren und ETB als Verunreinigungen wurde die Messunsicherheit des Verfahrens der Reinheitsbestimmung mit der quantitativen  $^{13}\text{C}$ -MP-NMR ermittelt. Hierzu wurde eine Xylol-Lösung hergestellt, die o-, m- und p-Xylol sowie ETB in ungefähr gleichen Intensitätsverhältnissen enthielt. Durol, dessen Reinheit auf ZRM Benzoesäure rückgeführt wurde, diente als interner Standard. Bei einem 95%igen Konfidenzintervall wurde generell sowohl die relative erweiterte Unsicherheit des Analysenergebnisses als auch die relative Messunsicherheit des Verfahrens (Referenzwert: Herstellerangabe) für die Reinheitsanalyse für jede der vier Komponenten zu unter 2 % bestimmt. Die Abweichungen der Analysenwerte zu den Referenzwerten stellten sich als geringfügig heraus. Diese an der hier untersuchten Modell-Lösung erarbeiteten Erkenntnisse sind auf jede reale Xylol-Probe übertragbar, da deren Spektren aufgrund der geringeren Signalintensitäten der enthaltenen Verunreinigungen gegenüber dem hier betrachteten Modell-System einfacher auswertbar sind. Wie auch bei dem Verfahren der Reinheitsbestimmung mit der  $^1\text{H}$ -NMR dominierten hier die Unsicherheitsbeiträge der Integration (Auswertung) und der beiden Einwaagen (Analyt, Standard) im Unsicherheitsbudget. Die weiteren Unsicherheitsbeiträge der Molmassen von Analyt und Standard sowie des Reinheitsgrades vom Standard sind vernachlässigbar gering.

Anhand des internationalen Ringversuch CCQM-P20a (Reinheitsbestimmung von TBT-Cl) wurde die Messunsicherheit des NMR-Verfahrens mit der anderer Verfahren verglichen. Als interner Standard kam hier das ZRM Benzoesäure zum Einsatz. Es zeigte sich jedoch, dass die von der  $^1\text{H}$ -SP-NMR bewährten Vorgaben zur Auswertung ( $S/N > 150$ , Integrationsfaktor von 64) hier zu erheblichen Abweichungen führten. Bei einem  $S/N$  von ungefähr 280 und einem Integrationsfaktor von 64 wichen die Intensitäten der fünf einzeln integrierten  $^{13}\text{C}$ -Signale der Benzoesäure intramolekular um bis zu 5 % voneinander ab. Erst bei einem  $S/N > 500$  war deutlich die Überlagerung der vier aromatischen C-Signale der Benzoesäure zu erkennen. Die Erfassung dieser vier Signale mit einem Integralzug (Auswertung überlagelter Einzelsignale, Kapitel 5.3.2) war der Erfolg für ein gut mit den anderen Methoden übereinstimmendes Analysenergebnis von  $(95,8 \pm 1,3) \text{ g/g } \%$  für die Reinheit des TBT-Cl. Die hierbei angegebene erweiterte Unsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) wurde hauptsächlich durch den Unsicherheitsbeitrag der Integration bestimmt. Im Vergleich zur relativen Messunsicherheit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR von 1,5 % liegt die der  $^{13}\text{C}$ -MP-NMR unter denselben Bedingungen ( $S/N > 150$ , Integrationsfaktor: 64) nur geringfügig höher (2 %).

### 6.3 Zusammenfassung

Es wurden Arbeitsanweisungen zur Reinheitsbestimmung über die Hauptkomponentenanalyse mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR und der  $^{13}\text{C}$ -MP-NMR ausgearbeitet und an Modell-Systemen die Messunsicherheiten der Verfahren bestimmt. An realen Proben wurden die erarbeiteten Arbeitsanweisungen ausgetestet und mittels eines internationalen Ringversuchs mit anerkannten Analyseverfahren verglichen. Folgende Erkenntnisse wurden dabei gewonnen:

- Für die Reinheitsbestimmung mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR konnte die zur Bestimmung von Stoffmengenverhältnisse bewährte Arbeitsanweisung übernommen werden. Sie wurde lediglich um die Probenpräparation (Einwaage von Analyt und Standard in einem Intensitätsverhältnis der auszuwertenden Signale von ungefähr 1:1) erweitert.
- Bei der Wahl des internen Standards ist darauf zu achten, dass es zu keiner Überlagerungen der auszuwertenden Signalen kommt und ein Integrationsfaktor von mindestens 64 angesetzt werden kann. Ferner sollte der Reinheitsgrad des Standards nur eine geringe Unsicherheit aufweisen, um im Unsicherheitsbudget vernachlässigt werden zu können.
- Bei der Reinheitsbestimmung des Modell-Systems von Maleinsäure mit ZRM Benzoesäure führte die Auswertung mit einem größeren Integrationsfaktor von 200 (anstelle von 64) bei einem besseren  $S/N$  von größer als 10000 (anstatt größer 150) zu einer geringeren relativen Messunsicherheit des Verfahrens ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) von 1,0 % (1,5 % bei  $S/N > 150$ , Integrationsfaktor 64).
- Die Reinheitsanalyse mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR von realen Proben (Spiraeosid, Thymol, Loganin) im Rahmen einer Vorstudie (Reinheitsbestimmung von pharmazeutischen

Referenzmaterialien mit der quantitativen NMR-Spektroskopie) zeigte die wichtigen Vorarbeiten des Operators zur quantitativen Auswertung. Die eindeutige qualitative Zuordnung der Signale, die Überprüfung der Stabilität der Lösung und die Auswahl der Analytensignale, die zur Auswertung geeignet sind (keine Deuterierung, keine Fremdsignale im Integrationsbereich, Integrationsfaktor von mindestens 64 anwendbar), tragen zur Vermeidung systematischer Fehler und somit zu einer geringeren Messunsicherheit bei. Die relative Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) wurde bei einem  $S/N > 150$  und einem Integrationsfaktor von 64 zu unter 1,5 % berechnet. Diese wurde hauptsächlich durch die Unsicherheitsbeiträge der beiden Einwaagen (zu geringe zur Verfügung gestellte Substanzmenge) beeinflusst.

- Anhand der Reinheitsbestimmung einer Modell-Lösung von Xylol-Isomeren (o-, m- und p-Xylol sowie ETB) mit Duren als einen auf ZRM Benzoesäure zurückgeführten internen Standard wurde der Einsatz der quantitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR untersucht, wenn die quantitative  $^1\text{H}$ -NMR nicht anwendbar ist. Dabei ist die Aufnahmezeit (und damit verbunden die Entkopplungsdauer) entgegen der Arbeitsanweisung zur Aufnahme von SP-Experimenten auf 3 s zu begrenzen. Längere Aufnahmezeiten führten zu NOE-Effekten, und somit zur Intensitätsverfälschung in den Spektren. Die relative Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) bei einem  $S/N > 150$  und einem Integrationsfaktor von mindestens 64 wurde zu 2 % bestimmt, also nur geringfügig höher als mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR unter identischen Bedingungen (1,5 %). Jedoch ist der Zeitaufwand für eine quantitative  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung aufgrund der geringeren natürlichen Häufigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Isotops (1,1 %) um ein Vielfaches größer.
- Der Vergleich mit anderen Analysenverfahren bei der Reinheitsbestimmung von TBT-Cl (internationaler Ringversuch CCQM-P20a) zeigte, dass die quantitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR (hier mit ZRM Benzoesäure als internem Standard) mit einer relativen Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) von 2% eine Alternative ist.
- In das Unsicherheitsbudget gehen die Standardunsicherheiten der Integration, der beiden Einwaagen und Molmassen des Analyten und des Standards sowie des Reinheitsgrades vom Standard ein. Dabei sind die Unsicherheitsbeiträge der Molmassen und – bei geeigneter Wahl des Standards – der Unsicherheitsbeitrag des Reinheitsgrades vom Standard vernachlässigbar gering.
- Aufgrund der ermittelten Messunsicherheiten ist die Reinheitsbestimmung von Reinstsubstanzen (Reinheitsgrad  $\geq 99,9\text{ g/g } \%$ ) mit der quantitativen NMR-Spektroskopie mittels der Hauptkomponentenanalyse nicht möglich.



## 7 Gehaltsanalyse

Die Bestimmung des Gehaltes oder der Konzentration einer Komponente in einer Matrix gehört ebenso zu den Schwerpunkten der Analytik wie die Reinheitsbestimmung. Publikationen aus Bereichen wie z.B. der Pharmazie [51, 92, 93, 94, 39], der Agrar- [95, 96] und der Werkstofftechnik [97] zeigen, dass die quantitative NMR-Spektroskopie auch hier als analytisches Verfahren eingesetzt werden kann. Die in diesen Arbeiten angegebenen Präzisionen beruhen ausschließlich auf den experimentell ermittelten Standardabweichungen. Es sollte daher an Modell- und Referenzlösungen im Hinblick auf den internationalen Ringversuch CCQM-P35 ein Verfahren zur Gehaltsanalyse mit der NMR-Spektroskopie unter Berücksichtigung eines aufzustellenden Unsicherheitsbudgets erarbeitet werden

### 7.1 3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz in D<sub>2</sub>O

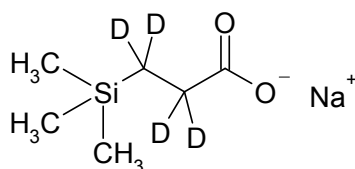


Abbildung 7.1: Struktur des 3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz.

3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz (TSP) (Abbildung 7.1) ist in der qualitativen <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ein gängiger Verschiebungsstandard in wässrigen Lösungen [16]. In mehreren Publikationen [93, 94, 39, 98] wurde es angesichts seiner optimalen Lage im Spektrum (0 ppm) und seines schmalen Singulett-Signals für quantitative Analysen als ein geeigneter Standard beschrieben. Wegen seiner hygroskopischen Eigenschaft kann es jedoch nur als Standardlösung eingesetzt werden. Daher wurde für die Ethanol-Gehaltsanalyse im folgenden Kapitel 7.2 eine Standardlösung mit einem Gehalt von  $(9,125 \pm 0,038)$  mg g<sup>-1</sup> TSP (Fa. Merck AG, Reinheitsgrad > 99 %) D<sub>2</sub>O angesetzt, deren genauer TSP-Gehalt zur weiteren Verwendung als internem Standard auf das ZRM Benzoessäure zurückgeführt werden sollte.

#### 7.1.1 Probenpräparation und Spektrenaufnahme

Die allgemeine Probenpräparation des Verfahrens der Gehaltsanalyse mit der NMR-Spektroskopie entspricht dem im Kapitel 6.1.1.1 beschriebenen allgemeinen Präparationsverfahren der Reinheitsbestimmung, wobei anstelle des Analyten die zu analysierende Matrix eingewogen wird. Die Spektrenaufnahme erfolgte mit den in der Tabelle 5.1 optimierten Parametern zur quantitativen Analyse. Zur Gehaltsanalyse des TSP wurden drei Aliquots, bestehend aus der TSP-Lösung und dem ZRM Benzoessäure als internem Standard, eingewogen (Tabelle 7.1) und 0,4 ml DMSO-d<sub>6</sub> zum vollständigen Lösen der Benzoessäure hinzugegeben. Die Spektrenaufnahme erfolgte entsprechend den bestimmten *T*<sub>1</sub>-Relaxa-

tionszeiten  $T_1(\text{ZRM}) < 4 \text{ s}$  und  $T_1(\text{TSP}) < 2,5 \text{ s}$  mit einem Relaxationsintervall von  $D1 = 30 \text{ s}$ . Die Akkumulation von 64 Scans führte zu einem ausreichenden S/N von ungefähr 7000.

Tabelle 7.1: Einwaagen der drei Aliquots zur Gehaltsanalyse der TSP-Standardlösung.

	Aliquot A	Aliquot B	Aliquot C
$m_{\text{TSP-Lösung}}$ in mg	982,8	990,9	1049
$m_{\text{Benzoessäure}}$ in mg	31,15	29,42	31,70

### 7.1.2 Auswertung

Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte nach der im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Arbeitsanweisung. Das in Abbildung 7.2 dargestellte  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum gibt bei 0 ppm das Signal vom TSP sowie bei 7,54 ppm ( $\text{H}_2$ ), 7,65 ppm (H) und 7,99 ppm ( $\text{H}_2$ ) die aromatischen Protonensignale der Benzoessäure wieder.

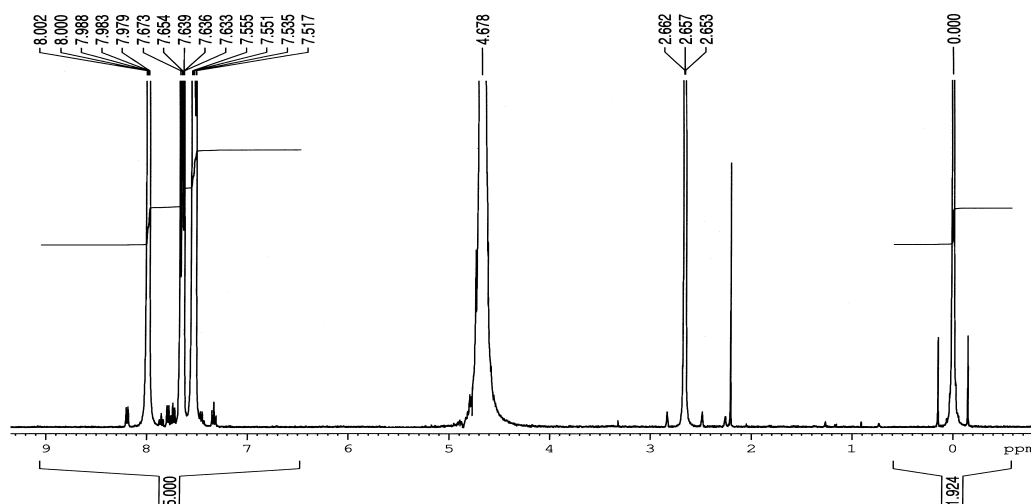


Abbildung 7.2:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Gehaltsanalyse des TSP mit Benzoessäure als internem Standard.

Die Auswertungen der Spektren (mit einem Integrationsfaktor von 500 bei Erfassung der drei Signale der Benzoessäure mit einem Integral) lieferten die in der Tabelle 7.2 aufgeführten, nach Gleichung (3.14) berechneten TSP-Gehalte.

Tabelle 7.2: Ergebnisse der TSP-Gehaltsanalyse der TSP-Standardlösung.

	Gehalt in $\text{mg g}^{-1}$			
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
Aliquot A	9,116	9,131	9,081	9,106
Aliquot B	9,084	9,135	9,097	9,149
Aliquot C	9,160	9,113	9,046	9,089

Aus den insgesamt zwölf Messungen wurde der Schätzwert des TSP-Gehalts der Standardlösung zu  $9,109 \text{ mg g}^{-1}$  mit einer geringen Standardunsicherheit von  $\pm 0,010 \text{ mg g}^{-1}$  bestimmt, die wie im Kapitel 6.1.1.2 auf das gute S/N von über 7000 für alle Signale und die großen Integrationsbereiche zurückzuführen war.

Die von Larive beschriebene zeitliche Konzentrationsabnahme vom TSP im wässrigen Medium durch Adsorption an den Glaswänden einer Kapillare [49] konnte nur partiell bestätigt werden. In den NMR-Messröhrchen wurden nach fünf Wochen beim Aliquot A der TSP-Gehalt mit einer Richtigkeit von besser als 99 % wiedergegeben, hingegen beim Aliquot C ein um 2 % relativ und beim Aliquot B ein um 6 % relativ geringerer TSP-Gehalt bestimmt. Der in der Stammlösung (aufbewahrt in einer 200 ml Schliffflasche) bei einer erneuten Einwaage von 31,79 mg ZRM und 1010,4 mg der TSP-Lösung ermittelte TSP-Gehalt von  $9,17 \text{ mg g}^{-1}$  bestätigte die Stabilität der Stammlösung über einen Zeitraum von zwei Monaten. Ursache für die partiell auftretenden zeitlichen Konzentrationsabnahmen des TSP ist das Verhältnis vom Volumen der Lösung zur benetzten Glasoberfläche. Je kleiner dieses Verhältnis ist (z.B. in der Kapillare), umso mehr TSP kann prozentual aus der Lösung adsorbiert werden. Zur Aufbewahrung einer TSP-Standardlösung ist daher auf ein großes Lösungsvolumen bei gleichzeitiger geringer Benetzung der Glasoberfläche zu achten.

### 7.1.3 Unsicherheitsbudget

In das allgemeine Unsicherheitsbudget für die Gehaltsanalyse mit der NMR-Spektroskopie gehen gemäß der Messgleichung (3.14) die Unsicherheit der Integration (Intensitätsverhältnis) nach Gleichung (4.1), die Unsicherheiten der Molmassen (Gleichung (4.6)) und Einwaagen (Gleichung (4.9)) von Analyt und Standard sowie die Unsicherheit des Reinheitsfaktors des Standards ein. Die kombinierte Unsicherheit berechnet sich demzufolge als Wurzel aus der Quadratsumme der Einzelunsicherheitsbeiträge nach Gleichung (4.13). In der Tabelle 7.3 wurden die einzelnen Unsicherheitsbeiträge sowie die daraus berechnete kombinierte Messunsicherheit für die Gehaltsanalyse der TSP-Standardlösung aufgeführt.

Tabelle 7.3: Unsicherheitsbudget des Verfahrens der Gehaltsanalyse des TSP mit ZRM Benzoesäure als internem Standard.

Unsicherheitsbeitrag	$x_i$	$u(x_i)$	$\frac{u(x_i)}{\bar{x}_i}$	$f_i$
Integration	9,109	0,010	0,11 %	11
Molmasse Benzoesäure	$122,121 \text{ g mol}^{-1}$	$0,006 \text{ g mol}^{-1}$	0,005 %	50
Molmasse TSP	$172,269 \text{ g mol}^{-1}$	$0,005 \text{ g mol}^{-1}$	0,003 %	50
Einwaage Benzoesäure	31,15 mg	0,03 mg	0,10 %	1000
Einwaage TSP-Lösung	982,8 mg	0,2 mg	0,02 %	1000
Reinheitsfaktor Benzoesäure	$0,999958 \text{ g g}^{-1}$	$0,000012 \text{ g g}^{-1}$	0,0012 %	11
Komb. Standardunsicherheit $u_c(y)$		$0,014 \text{ mg g}^{-1}$	0,15 %	37

Analog zur Reinheitsbestimmung beeinflussten auch hier hauptsächlich die Unsicherheiten der beiden Einwaagen und der Integration die kombinierte Standardunsicherheit. Entsprechend dem effektiven Freiheitsgrad von 37 wurde mit einem Erweiterungsfaktor von  $k = 2$  bei einem Konfidenzniveau von 95 % eine erweiterte Unsicherheit von  $U = \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$  ermittelt.

Aufgrund der Rückführung des Ergebnisses von der Gehaltsanalyse auf ein ZRM (äquivalent zur Reinheitsbestimmung der Maleinsäure im Kapitel 6.1.1) kann die TSP-Standardlösung für weitere quantitative Analysen als ein auf ein ZRM zurückgeführter Standard eingesetzt werden. Diese Standardlösung wurde den Teilnehmern des Ringversuches CCQM-P35 (Kapitel 7.3) als internem Standard zur Rückführung des Messwertes zugestellt.

#### 7.1.4 Messunsicherheit des Verfahrens

Zur Bestimmung der Messunsicherheit des Verfahrens wurde der Analysenwert auf den eingewogenen TSP-Gehalt referenziert. Der Analysenwert und dessen kombinierte Unsicherheit, die Abweichung zum Referenzwert, deren Unsicherheit sowie die nach Gleichung 4.15 daraus berechnete relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) von 1,0 % sind in Tabelle 7.4 dargestellt. Die Abweichung des Analysenwertes vom Referenzwert erwies sich als geringfügig.

Tabelle 7.4: Fehleranalyse und Bestimmung der relativen Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) des Verfahrens der Gehaltsanalyse mit der  $^1\text{H-NMR}$  am Beispiel des TSP-Gehalts mit ZRM Benzoessäure als internem Standard.

$x_{\text{Ref}}$ in $\text{mg g}^{-1}$	$\bar{x}_i$ in $\text{mg g}^{-1}$	$u_c(\bar{x}_i)$ in $\text{mg g}^{-1}$	$ \Delta x_i $ in $\text{mg g}^{-1}$	$2u(\Delta x_i)$ in $\text{mg g}^{-1}$	rel. $U$ in % ( $k = 2$ ; $p = 95$ )
$9,125 \pm 0,038$	9,109	0,014	0,016	0,081	1,0

Zusammenfassend wurde am Modell-System einer wässrigen TSP-Lösung (TSP in  $\text{D}_2\text{O}$ ) mit Benzoessäure als internem Standard die Messunsicherheit des Verfahrens der Gehaltsbestimmung untersucht. Der zu analysierende Stoffmengengehalt lag bei ungefähr  $50 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Wie auch bereits im Kapitel 6.1.1 führte die Auswertung der Spektren bei einem S/N von über 7000 und einem Integrationsfaktor von 500 zu einer relativen Messunsicherheit des Verfahrens ( $k = 2$ ;  $p = 95 \%$ ) von 1 %. TSP ist aufgrund seiner Lage im Spektrum und seines schmalen Singulett-Signals ein geeigneter interner Standard, sofern er als eine Lösung bekannten Gehalts eingesetzt wird. Die Stabilität dieser Lösung kann über einen längeren Zeitraum gesichert werden, wenn bei der Aufbewahrung auf ein großes Verhältnis zwischen Volumen und benetzter Glasoberfläche geachtet wird. Durch die Rückführung mittel des ZRM Benzoessäure steht er somit als ein auf ein ZRM zurückgeführter Standard zur Verfügung.

## 7.2 Ethanol in Wasser (forensische Chemie)

Seit 2001 werden an der BAM in der Fachgruppe I.2 forensische Ethanol-Referenzlösungen (Ethanol-Gehalt um die 0,1%) für Atemalkohol-Messungen hergestellt und mit einem Referenzverfahren unter Einsatz der Gas-Chromatographie (GC) kontrolliert [99].

Die NMR-Spektroskopie sollte vom Prinzip her die Analyse der Ethanol-Gehaltsbestimmung solcher Referenzlösungen schnell und einfach lösen können. Da in der Literatur bisher kein solches Analysenverfahren mit der quantitativen NMR-Spektroskopie beschrieben wurde, sollte erstmals ein Verfahren entwickelt werden. So war für die Vorbereitung von Ringversuchen auf nationaler (NMR-3) und internationaler Ebene (CCQM-P35) für die Ermittlung der metrologischen Güte des Verfahrens (vom Labor I.31 organisiert) eine Arbeitsanweisung zu erarbeiten, nach der an jedem NMR-Spektrometer die Gehaltsanalysen solcher Referenzlösungen mit einem auf SI-Einheiten zurückgeführten Unsicherheitsbudget bearbeitet werden können. Bei einer ausreichenden Messunsicherheit dieses Verfahrens könnte die quantitative NMR in dieses Referenzverfahren eingegliedert werden.

Die in dieser Arbeit dargestellte Reihenfolge der Ergebnisse entspricht nicht dem zeitlichen Ablauf. Erfahrungen mit dem Umgang von wässrigen Ethanollösungen sowie mit NMR-Wasserunterdrückungstechniken waren im Labor nicht vorhanden und mussten schrittweise erworben werden.

### 7.2.1 Direkte Auswertung ohne Standard

In dem speziellen Fall, dass die zu untersuchende Lösung aus genau zwei Komponenten besteht, kann der Gehalt direkt aus dem Verhältnis der Intensitäten der beiden auszuwertenden Signalen berechnet werden.

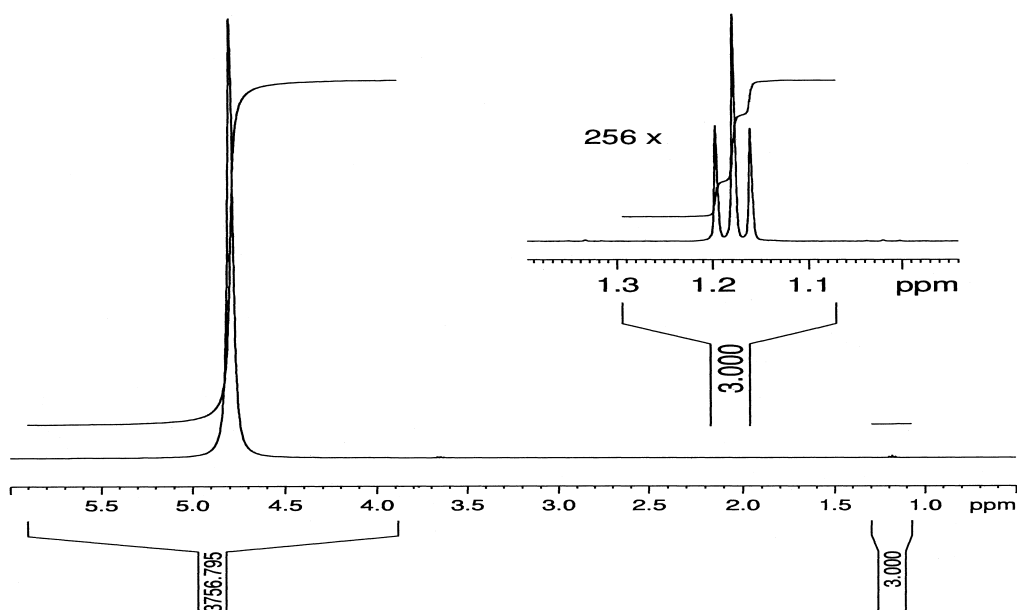


Abbildung 7.3:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Ethanol-Gehaltsbestimmung aus dem Verhältnis der Intensitäten des Ethanol-Signals ( $\text{CH}_3$ ) und des Wasser-Signals.

Für das hier betrachtete System (Ethanol und entionisiertes Wasser, Abbildung 7.3) wurde aus den Intensitäten des Wassersignals (4,8 ppm) und des CH<sub>3</sub>-Ethanolsignals (1,18 ppm) der Ethanol-Gehalt nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\frac{m_{\text{Ethanol}}}{m_{\text{H}_2\text{O}} + m_{\text{Ethanol}}} = \frac{\frac{I_{\text{Ethanol (CH}_3)}}{3} \cdot M_{\text{Ethanol}}}{\frac{I_{\text{H}_2\text{O}} - I_{\text{Ethanol (CH}_3)} / 3}{2} \cdot M_{\text{H}_2\text{O}} + \frac{I_{\text{Ethanol (CH}_3)}}{3} \cdot M_{\text{Ethanol}}} \quad (7.1)$$

$$= \frac{1}{1 + \left( \frac{I_{\text{H}_2\text{O}} - I_{\text{Ethanol (CH}_3)} / 3}{I_{\text{Ethanol (CH}_3)}} \cdot \frac{3}{2} \cdot \frac{M_{\text{H}_2\text{O}}}{M_{\text{Ethanol}}} \right)}$$

wobei der Term  $I_{\text{H}_2\text{O}} - I_{\text{Ethanol(CH}_3)} / 3$  das mit dem Wassersignal überlagernde OH-Signal des Ethanols berücksichtigt. Die quantitative Aufnahme und Auswertung nach der im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Arbeitsanweisung (D1 = 30 s, ns = 1810, Integrationsfaktor 64) führte zu einem hinsichtlich des GC-Referenzwertes um 4 % zu hoch liegenden Ethanol-Gehalt von 1,36 mg g<sup>-1</sup>. Das S/N von 1800 für das CH<sub>3</sub>-Ethanolsignal reichte für eine präzise Auswertung aus. Hingegen kann die enorme Verbreiterung des Wassersignals durch Radiation Damping diese Abweichung des Analysenergebnisses verursacht haben. Wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben, bewirken von einander sich stark unterscheidende Halbwertsbreiten der auszuwertenden Signale einen unterschiedlichen Grad an Nichterfassung der auftretenden Emission während der Aufnahmeverzögerung (Pulse-Delay, Totzeit). Dieses führt zu signifikant abweichenden Analysenergebnissen [24].

## 7.2.2 Auswahl an internen Standards

Wie die Analyse im Kapitel 7.2.1 zeigte, war eine genaue Gehaltsbestimmung ohne Standard nicht möglich. Es sollte daher der Ethanol-Gehalt über die Rückführung auf einen internen Standard ermittelt werden. Die beiden folgenden Standards wurden ausgewählt:

- **3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz:** Das Protonensignal des TSP war im Spektrum mit einer Lage bei 0 ppm weit genug entfernt vom Wassersignal. Die in geringer Intensität vorhandenen undeutierten CH<sub>2</sub>-Signale bei 1,21 ppm und 1,84 ppm behinderten die Auswertung des Ethanols nicht. Ferner war hinsichtlich der Verwendung einer Standardlösung, deren Gehaltsbestimmung im Kapitel 7.1 beschrieben wurde, eine größere Einwaage möglich, die zu einer geringeren Einwaageunsicherheit führte. Insgesamt erschien daher die TSP-Standardlösung als ein idealer Standard für dieses quantitative Problem.
- **Maleinsäure:** Bei der Maleinsäure lag das Protonensignal (6,44 ppm) näher am Wassersignal als das des TSP, jedoch für die Analyse ausreichend entfernt. Für die Maleinsäure spricht die Stabilität des Reinheitsgrads, der keiner zeitlichen Veränderung unterliegt, wie er beim Gehalt der TSP-Standardlösung beobachtet wurde.

Beide Standards wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit auf das ZRM Benzoesäure zurückgeführt (TSP-Standardlösung: Kapitel 7.1; Maleinsäure: Kapitel 6.1.1) und können infolgedessen als auf ein ZRM zurückgeführte Standards eingesetzt werden. Somit ist die Rückführung der Analysenergebnisse der Ethanol-Gehaltsbestimmung auf die SI-Einheiten gegeben.

### 7.2.3 Single-Puls-Experiment

Zur Analyse des Ethanol-Gehalts über einen internen Standard wurden 153,9 mg TSP-Standardlösung zu 1038,5 mg einer Ethanol-Referenzlösung eingewogen. Die quantitative Aufnahme und Auswertung erfolgte wie bereits im Kapitel 7.2 beschrieben, jedoch mit einer Akkumulation von 128 Scans. Das so erhaltene Spektrum erwies sich als auswertbar und der ermittelte Ethanol-Gehalt von  $1,026 \text{ mg g}^{-1}$  wich vom gravimetrischen Referenzwert von  $(1,032 \pm 0,001) \text{ mg g}^{-1}$  um weniger als 1 % ab. Aufgrund des großen Signalhöhen-Unterschieds zwischen dem Wassersignal und den Signalen des Ethanols und des TSP kommt es zu einer schlechten Ausnutzung des dynamischen Bereiches für die auszuwertenden Signale. Somit könnten NMR-Geräte mit einer geringen Wortlänge des ADCs (z.B. 8 Bit) Probleme bei der Intensitätswiedergabe dieser Signale haben. Es wurden daher Methoden zur Verbesserung des dynamischen Bereiches untersucht.

### 7.2.4 Wasser-Unterdrückungsmethoden (Multi-Puls-Experimente)

Um die vertikale Auflösung der auszuwertenden Signale zu verbessern, war die Reduzierung des Wassersignal notwendig. Hierzu wurden drei ausgewählte Unterdrückungs-Sequenzen, deren Grundlagen bereits im Kapitel 3.3 beschrieben wurden,

- Presaturation (einfachste Unterdrückungsmethode)
- Watergate (am weitverbreitetste Unterdrückungsmethode [39])
- LC1WET (unabhängig von  $B_1$ -Feldinhomogenitäten)

auf ihre quantitativen Eigenschaften hin untersucht und miteinander verglichen.

#### 7.2.4.1 Presaturation

Die Vorsättigungstechnik (Presaturation) enthält von den drei ausgewählten Unterdrückungsmethoden die einfachste Multi-Pulse (MP)-Sequenz, die im Vergleich zur SP-Technik nur einen weiteren Impuls, den der Vorsättigung, enthält. Aufbauend auf der Validierung der SP-Methode war dieser Vorsättigungsimpuls zu optimieren.

Das von Bruker mitgelieferte Pulsprogramm „zgpr“ ist für qualitative Messungen ausgelegt (Sättigung während des gesamten Relaxationsintervalls). Für quantitative Messungen wurde in einer modifizierten Pulssequenz („zgpr.fm“) die Sättigungsdauer vom Relaxationsintervall getrennt (das Bruker- und das modifizierte Pulsprogramm sind im Kapitel 11.3 aufgeführt). Bei dieser routinemäßig eingesetzten cw-Presaturation-Technik erfolgt die Einstrahlung des Sättigungs- und Anregungsimpuls aus der gleichen Richtung ( $p_1(x)$   $p_2(x)$ ). Zum Vergleich wurde eine entsprechende Presaturation-Sequenz (phase-gated, pg) untersucht, bei der die beiden Impulse um  $90^\circ$  versetzt ( $p_1(x)$   $p_2(y)$ ) eingestrahlt werden („zgpr.jp“). Mao et al. [73] beschreibt bei Anwendung dieser pg-Presaturation-Technik im Gegensatz zur cw-Presaturation eine besseren Sättigung des Wassersignals.

#### 7.2.4.1.1 Optimierung des Sättigungspulses

Die Optimierung des Sättigungsimpulses erfolgte an zwei Modell-Lösungen, bestehend aus Ethanol in  $D_2O$  mit TSP als Referenzsignal. Hierbei wurden die Sättigungsstärke und -länge jeweils einzeln variiert. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte nach der Arbeitsanweisung im Kapitel 5.1.2 ( $D1 = 60$  s,  $ns = 32$ , Integrationsfaktor = 200).

Zur Optimierung der Sättigungsstärke wurde diese ausgehend von einer Dämpfung von 66 dB in 6 dB Schritten bis 42 dB variiert. Die Sättigungsdauer von 1,5 s wurde dabei konstant gehalten. Die aus jeweils fünf Messungen ermittelten Schätzwerte der Intensitätsverhältnisse zwischen  $CH_2$ -Ethanol- und TSP-Signal bzw.  $CH_3$ -Ethanol- und TSP-Signal sowie deren Standardunsicherheiten sind für die entsprechenden Leistungen des Sättigungsimpulses in der Tabelle 7.5 aufgelistet.

Tabelle 7.5: Variation des Impulsleistung des Sättigungsimpulses beim Presaturation. Auswertung des Intensitätsverhältnisse zwischen den Ethanolsignalen und dem TSP-Signal.

		SP (90°)	Impulsleistung des Sättigungspulses				
			66 dB (28 Hz)	60 dB (49 Hz)	54 dB (105 Hz)	48 dB (213 Hz)	42 dB (426 Hz)
CH <sub>2</sub> -	$I_{CH_2}/I_{TSP}$	9,054	8,982	8,847	8,56	7,50	5,04
Ethanol	$u(x)$	0,027	0,018	0,027	0,04	0,05	0,05
CH <sub>3</sub> -	$I_{CH_3}/I_{TSP}$	13,585	13,56	13,523	13,55	13,51	13,10
Ethanol	$u(x)$	0,027	0,04	0,027	0,05	0,05	0,08

Aus dieser Tabelle ist deutlich die mit zunehmender Sättigungsleistung stärker werdende Teilsättigung des  $CH_2$ -Ethanolsignals erkennbar. Dass die Angabe der Impulsleistung in dB weder zwischen Bruker-Spektrometern (abhängig von der Gerätekonstellation) einheitlich noch zu NMR-Spektrometern der Hersteller Varian und Jeol eindeutig ist, war zu diesem Zeitpunkt der Arbeit im Labor nicht bekannt. Erst im Verlaufe der Auswertung des nationalen



Ringversuches NMR-3 (Kapitel 7.3.3) stellte sich dieses Problem heraus. Die Angabe der entsprechenden Anregungsbreite in Hz ist dagegen ein allgemeingültiger Parameter, aus dem an jedem NMR-Spektrometer die Sättigungsleistung ermittelt werden kann. Daher wurden zusätzlich zu den Impulsleistungen des hier eingesetzten NMR-Spektrometers die entsprechenden Anregungsbreiten des Vorsättigungsimpulses aufgeführt.

Zur Verdeutlichung des Einflusses der Sättigungsstärke auf die Intensitäten der Ethanol-signale wurden die ermittelten Intensitätsverhältnisse der jeweiligen Sättigungsleistung auf die der SP-90°-Messung referenziert und in Abbildung 7.4 dargestellt.

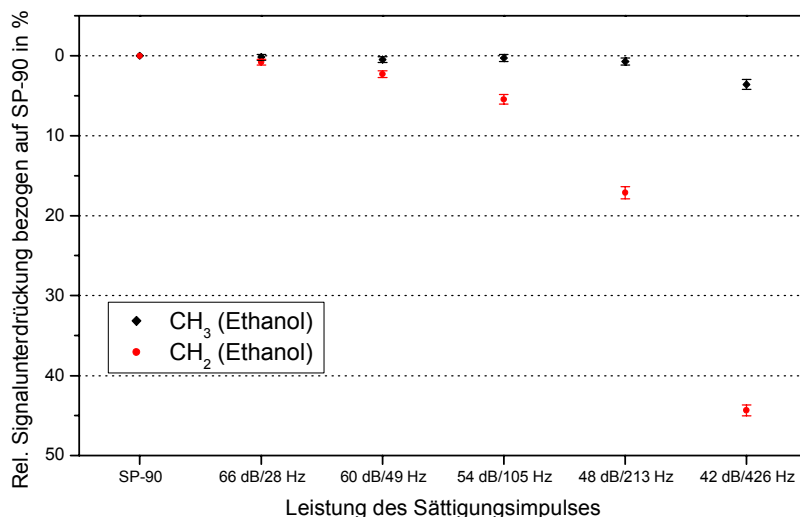


Abbildung 7.4: Abhängigkeit der partiellen Mitsättigung der beiden Ethanol-signale von der Stärke des Sättigungsimpulses bei Sättigung des Wassersignals mit Presaturation.

Dieses Diagramm gibt die partielle Intensitätssättigung des CH<sub>2</sub>- bzw. CH<sub>3</sub>-Ethanol-signals in Abhängigkeit von der Sättigungsstärke wieder. Die dabei eingezeichneten kombinierten Messunsicherheiten berechneten sich aus den Unsicherheitsbeiträgen der Referenzmessung (SP-90)  $u(x_{SP})$  und des Messwertes  $u(x_i)$  nach folgender Gleichung:

$$\frac{u_c(x_i)}{x_i} = \sqrt{\left(\frac{u(x_i)}{x_i}\right)^2 + \left(\frac{u(x_{SP})}{x_{SP}}\right)^2} \quad (7.2)$$

Mit zunehmender Impulsleistung des Sättigungsimpulses stellte sich eine Verbreiterung des Sättigungsbereiches ein. Bereits ab einer Impulsstärke von 60 dB (49 Hz Anregungsbreite) wird das näher am Wassersignal liegende CH<sub>2</sub>-Ethanol-signal (Abstand von ca. 450 Hz) signifikant mitgesättigt. Das CH<sub>3</sub>-Signal erfährt aufgrund des größeren Abstands zum Wassersignal (ca. 1440 Hz) erst bei einer Sättigungsstärke von 42 dB (426 Hz Anregungsbreite) eine signifikante Mitsättigung. Die Intensität des CH<sub>2</sub>-Ethanol-signals wird bei dieser Leistung des Sättigungsimpulses bereits um fast 50 % reduziert.

Als optimaler Parameterwert für die Sättigungsstärke am 400 MHz-Spektrometer (TXI-Messkopf) erwies sich eine Dämpfung von 66 dB, die einer Anregungsbreite des

Vorsättigungsimpulses von 20 Hz bis 30 Hz entspricht. Bei dieser Sättigungsleistung werden beide Signale des Ethanols, und damit auch die der beiden in dieser Arbeit betrachteten Standards, noch nicht beeinflusst.

Der zweite Parameter, die Sättigungsdauer, wurde bei einer Pulsstärke variiert, die einer Anregungsbreite von 40 Hz entspricht. Hier wurden dem SP-90°-Experiment – als Referenzspektrum – Presaturation-Experimente mit Sättigungsimpulslängen von 1,5 s, 5 s, 10 s und 60 s gegenübergestellt. Zusätzlich wurde das Bruker-Presaturation-Pulsprogramm zgpr ausgetestet, bei dem zeitgleich zum Relaxationsintervall ( $D1 = 60$  s) die Sättigung des Wassersignals erfolgt. Die Spektren wurden analog zur Optimierung der Pulsstärke aufgenommen und ausgewertet. In der Tabelle 7.6 sind die auf das TSP-Signal normierten Intensitäten des  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignals aufgeführt.

Tabelle 7.6: Variation der Länge des Sättigungsimpulses beim Presaturation. Auswertung des Intensitätsverhältnisse zwischen dem  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignal und dem TSP-Signal.

		SP (90°)	Impulslänge des Sättigungspulses				
			1,5s	5 s	10 s	60 s	zgpr ( $D1=60$ s)
$\text{CH}_3$ -	$I_{\text{CH}_3}/I_{\text{TSP}}$	2,430	2,434	2,483	2,525	2,554	2,551
Ethanol	$u(x)$	0,007	0,005	0,005	0,013	0,018	0,015

Die Darstellung in Abbildung 7.5, welche die relativen Signalintensitätsveränderung des beobachteten  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignals bezogen auf das SP-90°-Experiment wiedergibt, verdeutlicht die Abhängigkeit von der Sättigungsdauer.

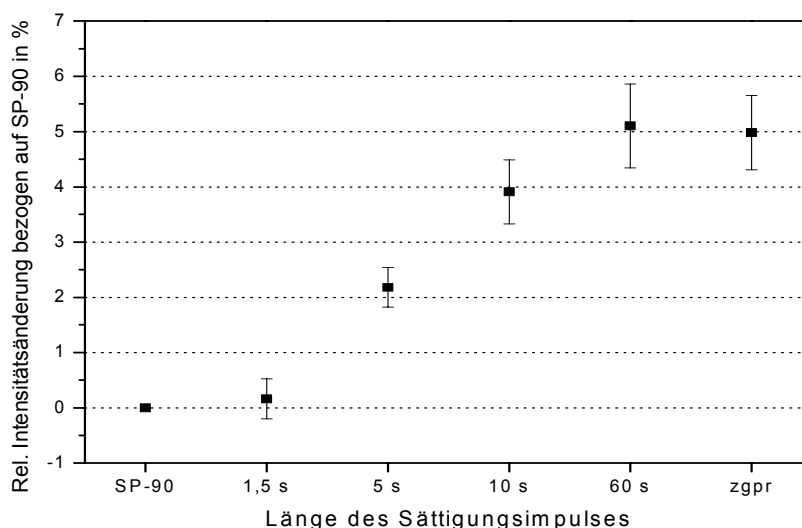


Abbildung 7.5: Abhängigkeit der Signalintensitätsverstärkung des  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignals von der Länge des Sättigungsimpulses bei Sättigung des Wassersignals mit Presaturation

Die Unsicherheitsbalken geben die kombinierte Messunsicherheit, nach Gleichung (7.2) berechnet, wieder. Mit zunehmender Sättigungsdauer wurde hier eine stetig steigende Intensitätsverstärkung des  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignals beobachtet. Lediglich eine Vorsättigungsdauer von 1,5 s gibt die Intensität des  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignals im Vergleich zum Referenzspektrum richtig wieder. Die Einstrahlung des Sättigungsimpulses auf das Wassersignal, und somit auch auf das OH-Signal des Ethanol, induziert NOE-Effekte, die sich auf die anderen beiden Strukturgruppen des Ethanol auswirken. Aufgrund der gewinkelten Anordnung des Ethanol ist dabei ein positiver NOE-Effekt beim  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignal zu beobachten (Kapitel 3.4). Mit zunehmender Einstrahldauer werden diese intensiver. NOE-Differenzspektren an dieser Modell-Lösung bestätigten den positiven NOE-Effekt auf die  $\text{CH}_3$ -Gruppe des Ethanol. Eine Sättigungsdauer von 1,5 s erwies sich als optimal.

Zusammenfassend ist als optimaler Parameter für die Sättigungslänge zur quantitativen Anwendung der  $^1\text{H}$ -Presaturation-Technik wurden bei der Optimierung des Vorsättigungsimpulses eine Dauer von 1,5 s bestimmt. Ferner ist die Sättigungsleistung so zu setzen, dass eine Anregungsbreite des Sättigungsimpulses von 20 Hz bis 30 Hz erreicht wird. Mit diesen Parametern sollten generell an jedem NMR-Spektrometer die Intensitäten des Ethanol und der beiden hier betrachteten Standards bei quantitativ aufgenommenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren mit Presaturation des Wassersignals mit einer Richtigkeit von besser als 99 % wiedergegeben werden. Stärkere und längere Sättigungsimpulse führten zur besseren Sättigung des Wassersignals, verfälschten aber die Intensitätswiedergabe der Ethanol signale im Spektrum.

#### 7.2.4.2 *Watergate*

Während die Presaturation-Technik an jeder NMR-Gerätekonstellation eingesetzt werden kann, benötigt die Watergate-Sequenz Gradiententechnik (z-Gradientenverstärker, Messkopf mit z-Gradient). Der in dieser Arbeit verwendete z-Gradientenverstärker leistete anstelle der üblichen 10 A eine Leistung von 40 A. Dadurch mussten die Gradientenstärken im Pulsprogramm („p3919gp“) von 20 % auf 5 % herabgesetzt werden. Als Messkopf wurde der 5 mm TXI mit z-Gradient verwendet. Die Messparameter wurden entsprechend den Vorgaben des Pulsprogramms gesetzt; unter Berücksichtigung der Parameter aus Tabelle 5.1 zur quantitativen Aufnahme ( $D1 = 60$  s und  $ns = 32$ ). Das so aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Modell-Lösung zeigte ein Restwassersignal geringer Intensität. Dabei wurden die Multiplett-Signale des Ethanol im Gegensatz zum Singulett-Signal des TSP mit Phasenfehler dargestellt (Abbildung 7.6). Ursache für diese Phasenfehler ist die zeitliche Weiterentwicklung der Spin-Spin-Kopplungen, die nicht durch die Spin-Echo-Sequenz beeinflusst werden. Dabei wird die Mitte eines Multipletts phasenrichtig wiedergegeben und mit größer werdenden Abstand zur Multiplett-Mitte ein wachsender Phasenfehler aufgebaut.

Dieser Phasenfehler  $\phi$  lässt sich in Abhängigkeit der Sequenzlänge  $\tau$  und der Kopplungskonstante  $J$  nach folgender Gleichung berechnen:

$$\phi = 2\pi \cdot \tau \cdot J \hat{=} 360^\circ \cdot \tau \cdot J . \quad (7.3)$$

Entsprechend dieser Gleichung wurde für die hier eingesetzte Watergate-Sequenz mit einer Sequenzlänge von  $\tau = 7,8$  ms und der Kopplungskonstante des ausgewerteten Signals von  $J = 7$  Hz ein Phasenfehler von  $19,7^\circ$  berechnet.

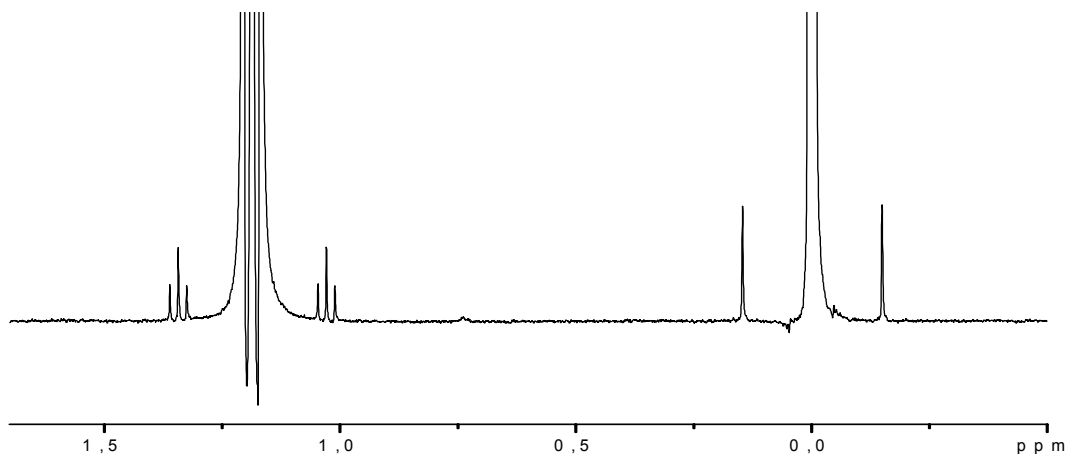


Abbildung 7.6:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer forensischen Ethanol-Probe mit Watergate aufgenommen. Phasenfehler beim Triplettsignal der  $\text{CH}_3$ -Protonen des Ethanols.

#### 7.2.4.2.1 Einfluss des optimalen Gradientenverhältnisses

Nach den Vorgaben von Bruker sollen im Pulsprogramm zwei Gradientenpulse gleicher Stärke verwendet werden. Mittels des Gradienten-Echo-Tests (Experiment 11.3 aus [37]) wurde das Verhältnis der beiden Gradientenstärken zu 5 % : 4,7 % (maximale Intensitätswiedergabe) optimiert. Ein Einfluss auf das Analysenergebnis wurde dabei nicht festgestellt, da alle Signale in der gleichen Art und Weise davon betroffen waren.

#### 7.2.4.2.2 Modifizierte Watergate-Sequenzen

Liu et al. [100] beschreibt den Einsatz zweier modifizierter Watergate-Sequenzen (W4 und W5), die im Vergleich zur ursprünglichen Watergate-Sequenz eine bessere Selektivität der Wasserunterdrückung aufweisen. Bei diesen beiden Sequenzen wird die aus drei Impuls-Paaren aufgebaute Spin-Echo-Sequenz durch Sequenzen mit vier (W4:  $10,4^\circ$ ,  $29,4^\circ$ ,  $60,5^\circ$  und  $132,8^\circ$ ) bzw. fünf (W5:  $7,8^\circ$ ,  $18,5^\circ$ ,  $37,2^\circ$ ,  $70,4^\circ$  und  $134,2^\circ$ ) symmetrisch aufgebauten Impuls-Paaren ersetzt. Die demzufolge längeren Sequenzlängen  $\tau$  (zwischen  $90^\circ$ -Anregungsimpuls und Beginn der Aufnahme) von 8,4 ms bei der W4-Sequenz und 9,0 ms bei der W5-Sequenz führten zu größeren Phasenfehlern  $\phi$  bei den Multiplett-Signalen ( $21,2^\circ$  bzw.

$22,7^\circ$  nach Gleichung 7.3). Diese sind in der Abbildung 7.7 am Beispiel des Triplet-Ethanolsignals der ursprünglichen Watergate-Sequenz gegenübergestellt.

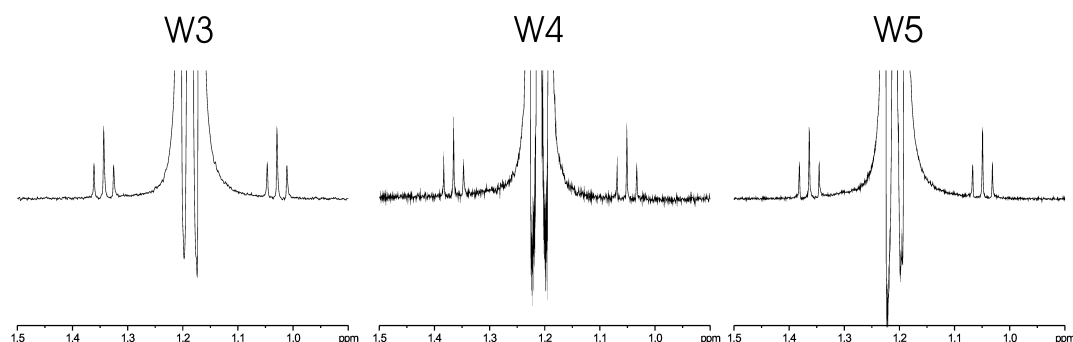


Abbildung 7.7: Zunahme des Phasenfehlers beim Triplet-Signal des Ethanol in Abhängigkeit von der Sequenzlänge  $\tau$ . W3 (Original-Watergate-Sequenz):  $\tau = 7,8$  ms; W4-Sequenz:  $\tau = 8,4$  ms; W5-Sequenz:  $\tau = 9,0$  ms.

Beim Exciting Sculpting, einer weiteren Modifikation der Watergate-Technik, wird die Watergate-Sequenz zweimal hintereinander mit unterschiedlichen Gradientenstärken (10 : 1,75) eingesetzt (Experiment 11.14 nach [37]). Wegen der nun deutlich längeren Sequenzlänge  $\tau$  von 15,6 ms werden die Multiplett-Signale des Ethanol mit einem nach Gleichung (7.3) berechneten Phasenfehler von  $39^\circ$  im Spektrum wiedergegeben. Wie in der Abbildung 7.8 dargestellt, ist die Triplet-Form des auszuwertenden  $\text{CH}_3$ -Ethanolsignals aufgrund des Phasenfehlers nicht mehr eindeutig erkennbar.

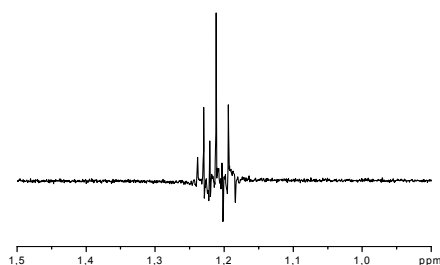


Abbildung 7.8: Triplet des Ethanol bei Unterdrückung des Wasser-Signals mit der doppelten Watergate-Sequenz

Angeichts der größer werdenden Phasenfehler wurden die modifizierten Watergate-Sequenzen für die Anwendung zur quantitativen Auswertung nicht weiter betrachtet.

#### 7.2.4.3 LC1WET

Die LC1WET-Technik setzt ebenso wie die Watergate-Sequenz Gradiententechnik voraus. Analog zur Untersuchung der Watergate-Sequenz wurden hier die im Pulsprogramm vorgeschriebenen Parametern (Gradientenstärken im Pulsprogramm durch vier dividiert) unter Berücksichtigung der Parameter zur quantitativen Aufnahme von NMR-Spektren aus

Tabelle 5.1 verwendet ( $D1 = 60$  s,  $ns = 32$ ). Hierzu wurde nach Experiment 7.1 [37] der optimale Shape-Impuls zu  $65,4 \mu\text{s}$  bestimmt. Das mit diesen Parametern aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte ein schmales Restwassersignal mit geringer Intensität und gut auswertbaren Signalen des Ethanols und des Standards.

### 7.2.5 Vergleich der Wasserunterdrückungsmethoden

In diesem Kapitel sollen die drei Wasserunterdrückungsmethoden anhand von vier Kriterien (Unterdrückung, Spektrenform, Anregungsprofil, Richtigkeit) unter Verwendung der im Kapitel 7.2.4.1.1 optimierten Parameter für die Presaturation-Technik mit einander verglichen werden. Die Experimente wurden, sofern nicht anders erwähnt, an einer Lösung bestehend aus 153,9 mg TSP-Standardlösung in 1038,5 mg einer forensischen Ethanol-Referenzlösung durchgeführt. Um unter identische Bedingungen den Vergleich durchzuführen, wurden die Spektren generell mit einem Relaxationsintervall von 60 s und einer Scananzahl von 32 aufgenommen.

#### 7.2.5.1 Erreichte Dämpfung des $\text{H}_2\text{O}$ -Signals

Zum Vergleich des Grades der erreichten Dämpfung des Wassersignals (Unterdrückung) wurden die Spektren der drei Wasserunterdrückungstechniken dem SP-90°-Experiments gegenübergestellt (Abbildung 7.9).

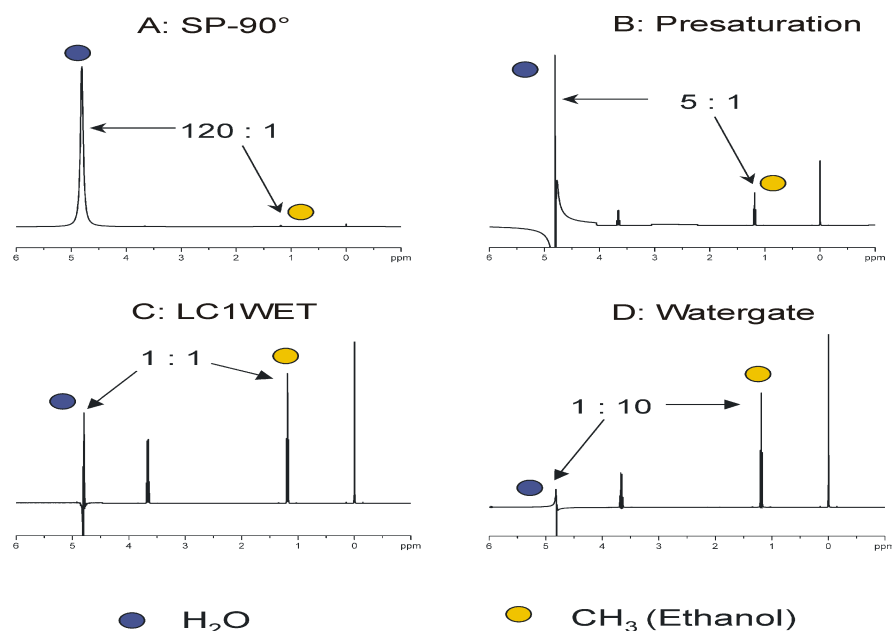


Abbildung 7.9: Vergleich der bewirkten Wasserunterdrückung, ausgehend von einem Signalhöhen-Verhältnis von 120 : 1 (Wasser :  $\text{CH}_3$ -Ethanol) des SP-Experiments.

Aus dieser Abbildung geht hervor, dass mit allen drei Techniken eine deutliche Unterdrückung des Wassersignals, und damit eine Verbesserung des dynamischen Bereiches erzielt wurde. Ausgehend von einem Signalamplitudenverhältnis zwischen dem Wasser- und dem  $\text{CH}_3$ -Ethanol signal von 120 : 1, wie in der Abbildung 7.9 dargestellt, wurde mit Presaturation durch Sättigung des Wassersignals ein Verhältnis von ungefähr 5 : 1 erhalten. Im Vergleich dazu konnte mit der LC1WET-Technik eine fünffach bessere (1 : 1) und mit der Watergate-Sequenz sogar eine 50fach bessere Wasserunterdrückung erzielt werden (1 : 10).

### 7.2.5.2 Spektrenform

Beim Vergleich der Spektrenformen wurde die Güte der Auswertbarkeit des Spektrums (Grundlinie und Form des Restwassersignals) beurteilt. In Abbildung 7.10 sind die Spektren der Wasserunterdrückung – nach manueller Phasenkorrektur – wiedergegeben.

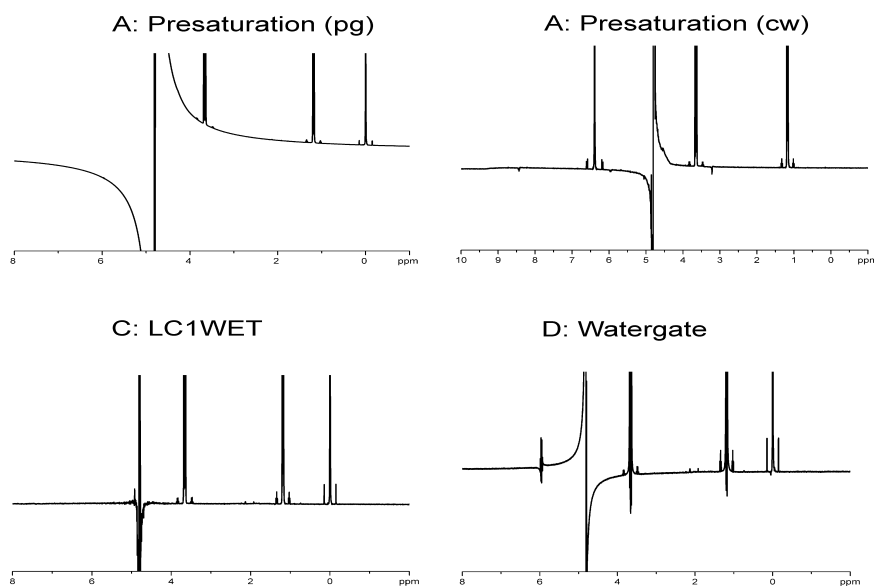


Abbildung 7.10: Vergleich der Spektrenformen nach manueller Phasenkorrektur.

Die LC1WET-Technik zeigte beim Vergleich der vier Unterdrückungstechniken die beste Spektrenform. Sie weist eine gerade Grundlinie und – aufgrund der Unabhängigkeit der Methode von  $B_1$ -Feldinhomogenitäten – ein sehr schmales Restwassersignal auf. Auch das Spektrum der Watergate-Sequenz gab eine gute Grundlinie wieder, hingegen enthält es ein dispersives und breites Restwassersignal. Das Spektrum der cw-Presaturation entsprach von der Form her dem der Watergate-Sequenz. Die schlechteste Spektrenform wurde bei der pg-Presaturation erhalten. Bedingt durch die um  $90^\circ$  versetzte Sättigungseinstrahlung baute sich während der Akkumulation ein immenser Phasenfehler des Restwassersignals auf. Dieser führte zu einer gekrümmten Grundlinie über den gesamten Spektrenbereich.

### 7.2.5.3 Anregungsprofil der Unterdrückungsmethoden

Der Vergleich der Profile der Unterdrückungsmethoden erfolgte an einer Modell-Lösung, bestehend aus Maleinsäure in D<sub>2</sub>O, da bei Anwendung der Watergate-Methode im Gegensatz zum Triplett-Ethanolsignal kein Phasenfehler bei dem Singulett-Signal der Maleinsäure entsteht. Ausgehend von der Lage des Maleinsäuresignals ( $\alpha_1 = 6,4$  ppm) wurde  $\alpha_1$  schrittweise um je 100 Hz Richtung Tieffeld versetzt und das Maleinsäure-Signal ausgewertet. Die Intensität des Maleinsäuresignals beim maximalen Offset von 1900 Hz wurde zur Referenzierung gleich eins gesetzt. Der Bezug der Intensitätswerte der übrigen Spektren auf diesen Referenzwert gibt das Profil und somit den Grad der Signalunterdrückung in Abhängigkeit vom Offset zur Einstrahlungsfrequenz der drei getesteten Methoden wieder.

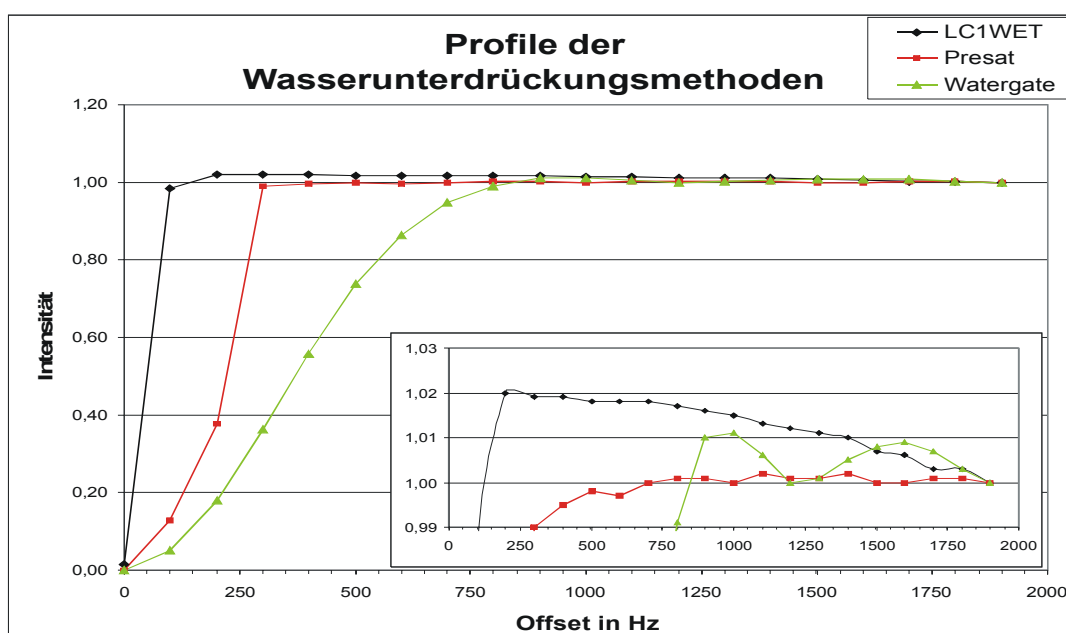


Abbildung 7.11: Signalunterdrückung in Abhängigkeit vom Offset der Einstrahlungsfrequenz. Vergleich der drei Wasserunterdrückungsmethoden Presaturation (Presat), LC1WET und Watergate. Der Wert eins gibt die volle Intensität wieder, der Wert Null vollständige Unterdrückung.

Aus der graphischen Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 7.11 geht hervor, dass von den drei untersuchten Unterdrückungsmethoden die LC1WET-Methode den schmalsten Unterdrückungsbereich, also die höchste Selektivität aufweist. Mit zunehmendem Offset von der Einstrahlungsfrequenz wurde dabei eine kontinuierliche Abnahme der Intensitätswiedergabe im Spektrum (über 1900 Hz 2 % relativ) beobachtet. Dieser Effekt ist nach Zhang et al. [40, 101] auf die Composite-Pulsfolge der LC1WET-Sequenz zurückzuführen. Der breiteste Unterdrückungsbereich (geringe Selektivität) wurde bei der Watergate-Sequenz festgestellt. Die Intensität des Maleinsäuresignals wurde noch bei einem Offset von 800 Hz zur Einstrahlungsfrequenz signifikant durch partielle Unterdrückung verfälscht im Spektrum wiedergegeben.



Größere Offsets geben einen sinusförmigen Verlauf (zurückzuführen auf die Binomial-Spin-Echo-Sequenz) der Intensitätswiedergabe in Abhängigkeit vom Offset wieder, deren Messwerte innerhalb eines Bereiches von 1% relativ liegen. Dieses aufgenommene Profil der Watergate-Sequenz steht in Übereinstimmung mit der Arbeit von Liu [100]. Die Breite des Sättigungsbereich vom Presaturation lag in ihrer Größenordnung zwischen dem der anderen beiden Methoden. Das Maleinsäuresignal wurde bei Offsets bis zu 300 Hz von der Einstrahlungsfrequenz signifikant mitgesättigt. Bei größeren Offsets wurde nur noch eine geringfügige Streuung der Intensitätswerte bezogen auf den Referenzwert beobachtet.

#### 7.2.5.4 Richtigkeit der Messergebnisse

Das wichtigste Vergleichskriterium war die richtige Intensitätswiedergabe der Signale von Ethanol und Standard im Spektrum. Der gravimetrische Referenzwert des Ethanol-Gehalts der eingesetzten Referenzlösung betrug  $(1,032 \pm 0,001) \text{ mg g}^{-1}$ . Mit der SP-90°-Technik wurde der Ethanol-Gehalt anhand einer Einzelmessung zu  $1,026 \text{ mg g}^{-1}$  und mit der pg-Presaturation-Methode zu  $1,028 \text{ mg g}^{-1}$  ermittelt. Anhand einer weiteren Modell-Lösung wurde gezeigt, dass zwischen pg- und cw-Presaturation kein signifikanter Unterschied in der Richtigkeit vorlag. Der Ethanol-Gehalt der Referenzlösung wurde mit der LC1WET-Technik zu  $1,037 \text{ mg g}^{-1}$  bestimmt, zum Referenzwert also nur + 0,5 % relativ abweichend, jedoch ungefähr 1 % relativ höher als mit dem SP- und dem Presaturation-Verfahren. Dies entspricht dem im Kapitel 7.2.5.3 beschriebenen Anregungsprofil der LC1WET-Technik. Der ermittelte Ethanol-Gehalt bei der Watergate-Sequenz wich mit  $1,002 \text{ mg g}^{-1}$  um 3 % relativ sowohl vom Referenzwert als auch vom Ergebnis der Presaturation ab. Zurückzuführen war dies auf den Phasenfehler  $\phi$  beim Triplett-Signal des Ethanols. Bei bekannter Größe des Phasenfehlers  $\phi$  kann die Intensität des Triplett-Signals folgendermaßen korrigiert werden:

$$I_{\text{kor}} = I_{\text{CH}_3} \cdot \frac{2}{1 + \cos \phi} \quad (7.4)$$

Dieser wurde bereits im Kapitel 7.2.4.2 zu  $19,7^\circ$  bestimmt. Somit ergibt sich nach Gleichung (7.4) ein korrigierter Ethanol-Gehalt von  $1,032 \text{ mg g}^{-1}$ , der vom gravimetrischen Referenzwert als auch von den Ergebnissen der SP-90°-Technik und der Presaturation um weniger als 0,5 % abweicht.

Insgesamt konnte mit allen drei Unterdrückungsmethoden Abweichungen der Analyseergebnisse zum gravimetrischen Referenzwert von unter 0,5 % erreicht werden. Jedoch nur beim Presaturation ist keine Korrektur des Ergebnisses nötig.

### 7.2.5.5 Diskussion und Zusammenfassung

Aus der Validierung und dem Vergleichen der drei Unterdrückungsmethoden wurden folgenden Schlussfolgerungen gezogen:

Bei der Optimierung des Vorsättigungsimpulses der Presaturation-Methode wurden als optimale Parameterwerte eine Sättigungslänge von 1,5 s bei einer Impulsleistung bestimmt, die einer Anregungsbreite von 20 Hz bis 30 Hz entspricht. Die mit diesen Parametern angewandte Presaturation-Technik bewirkte zwar die geringste Wasserunterdrückung der drei untersuchten Methoden, zeigte aber eine ausreichende Selektivität der Wasserunterdrückung – Signale des Ethanol und der beiden Standards wurden nicht beeinflusst – und lieferte Messergebnisse mit Abweichungen zum gravimetrischen Referenzwert von weniger als 0,5 %. Der von Mao et al. [73] diskutierte Vorteil der besseren Wasserunterdrückung bei Anwendung der pg-Presaturation ( $p_1(x) p_2(y)$ ) gegenüber der herkömmlichen cw-Sättigung ( $p_1(x) p_2(x)$ ) konnte nicht bestätigt werden. Viel mehr wurde durch den um 90° hinsichtlich des Anregungsimpulses versetzten Sättigungsimpulses ein immenser, die Auswertung erschwerender Phasenfehler des Restwassersignals aufgebaut. Die Anwendung der cw-Presaturation-Technik ist daher vorzuziehen.

Die LC1WET-Technik überzeugte beim Vergleich mit einer hervorragende Spektrenform (schmales Restwassersignal und gerade Grundlinie) und einer hohen Selektivität der Wasserunterdrückung. Andererseits wurde gezeigt, dass für quantitative Anwendungen eine Kalibrierung der Intensitätswiedergabe in Abhängigkeit vom Offset zur Einstrahlfrequenz nötig ist, um richtige Analysenergebnisse zu erhalten.

Die beste Wasserunterdrückung wurde mit der Watergate-Sequenz erzielt. Die dabei erreichte Spektrenform ist für die quantitative Auswertung ausreichend. Hingegen wurde bei der Watergate-Technik die geringste Selektivität der Wasserunterdrückung der drei untersuchten Methoden (größter Unterdrückungsbereich) ermittelt. So wurden bis zu einem Abstand von 800 Hz bezüglich der Einstrahlfrequenz signifikante Intensitätsverfälschungen durch partielle Unterdrückung bestimmt. Die durch Phasenfehler im Spektrum verfälschten Intensitäten von Multiplett-Signalen konnten aus den Werten der Sequenzlänge (zwischen 90°-Anregungsimpuls und Beginn der Aufnahme) und der Kopplungskonstante korrigiert werden.

Insgesamt sind alle drei Methoden für die Ethanol-Gehaltsbestimmung wässriger Lösungen (ca. 0,1 % Ethanol in  $H_2O$ ) anwendbar. Ferner lieferten alle drei Methoden richtige oder berechenbare Ergebnisse. Für die Auswahl der einzusetzenden Unterdrückungstechniken bei den Ringversuchen war die allgemeine (keine Gradiententechnik) und einfache Anwendbarkeit der Presaturation-Technik ausschlaggebend.

### 7.2.6 Erarbeitung eines Analysenverfahrens

Erstmalig wurde ein Analysenverfahren erarbeitet, mit dem wässrige Ethanol-Lösungen an jedem NMR-Spektrometer bei Anwendung der Presaturation zur Wassersättigung analysiert werden können. Diese Arbeitsanweisung baute auf den Erkenntnissen der in den vorangegangenen Kapiteln 7.2.4 und 7.2.5 beschriebenen Validierung der Presaturation-Methode auf. Es erfolgte eine schrittweise Verbesserung dieser Arbeitsanweisung anhand der Erfahrungen, die bei der Auswertung der beiden Ringversuchen CCQM-P35 und NMR-3 (werden im Kapitel 7.3 beschrieben) gewonnenen wurden.

#### 7.2.6.1 *Probenpräparation*

Generell ist die Probenpräparation ein wichtiger Arbeitsschritt der Analyse. Der hohe Dampfdruck des Ethanols macht hier eine besonders sorgfältige Arbeitsweise notwendig, wie eigene Experimente bestätigten. Als Probengefäß ist ein dicht schließendes Schraubglas mit Teflondichtung zu verwenden. Die Einwaage der Probenlösung und des internen Standards ist so zu berechnen, dass die Intensitäten der auszuwertenden Signale im Verhältnis von ungefähr 1 : 1 stehen und das Probengefäß fast vollständig befüllt wird (zur Minimierung des Verdampfens vom Ethanol aus der Lösung). Eine schnelle Prozedur des Einwägvorganges verhindert einen signifikanten Verlust an Ethanol. Das Probengefäß ist mit Parafilm zusätzlich abzudichten. Für eine ausreichende Homogenisierung der Lösung ist zu sorgen.

#### 7.2.6.2 *Spektrenaufnahme und -prozessierung*

Die Aufnahme des Spektrums erfolgt mit Presaturation-Technik zur Sättigung des Wassersignals. Dabei ist die Länge des Vorsättigungsimpuls auf 1,5 s einzustellen bei einer Sättigungsleistung, die einer Anregungsbreite von 20 Hz bis 30 Hz entspricht. Die weiteren Parameter zur Aufnahme und Prozessierung sind wie die in der Tabelle 5.1 aufgeführten Werte zu setzen (Ausnahme: Spektronweite = 16 ppm; Filterweite > 20 ppm). Ferner sind der Receiver Gain zur optimalen Ausnutzung des dynamischen Bereiches anzupassen, das Relaxationsintervall (D1) auf 60 s einzustellen und 32 Scans für ein ausreichendes S/N zu akkumulieren.

#### 7.2.6.3 *Auswertung*

Die Auswertung des Spektrums erfolgt analog zu der im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Arbeitsanweisung. Wegen der breiten Flanken des Wassersignals sind die Phasen- sowie Grundlinienkorrekturen sehr sorgfältig zu handhaben. Ausgewertet wird beim Ethanol das

CH<sub>3</sub>-Signal bei 1,18 ppm aufgrund des größeren Abstandes zum Wassersignal. Zur besseren Anpassung der Grundlinienkorrektur bei gegenüber dem Wassersignal hochfeldliegenden Signalen ist das Drehen des Spektrums (inverse x-Achsen-Skalierung) sinnvoll. Die Berechnung des Ethanol-Gehalts erfolgt nach Gleichung (3.14).

#### 7.2.7 Unsicherheitsbudget

Das Unsicherheitsbudget der Ethanol-Gehaltsanalyse setzt sich aus den Unsicherheiten der Integration (Intensitätsverhältnis zwischen Analyt und Standard), der Einwaagen und Molmassen des Standards und der Probenlösung sowie des Reinheitsfaktors des internen Standards zusammen. Die Berechnung der erweiterten Unsicherheit des Analysenergebnisses erfolgt analog dem im Kapitel 7.1.3 beschriebenen allgemeinen Verfahren.

### 7.3 Internationaler Ringversuch CCQM-P35

Nicht nur in Deutschland, sondern weltweit werden forensische Ethanol-Referenzlösungen für die Alkoholbestimmung im Straßenverkehr eingesetzt. Es ist daher wichtig, dass über die Landesgrenzen hinweg reproduzier- und vergleichbare Ergebnisse hoher Präzision und Richtigkeit erhalten werden [102]. 1997 wurde dazu vom CITAC (Co-operation on International Traceability in Analytical Chemistry [103]) ein internationaler Ringversuch durchgeführt. Obendrein ist Ethanol ein weltweit gehandelter Gebrauchsartikel. So sind z.B. für die international variierenden Verbrauchssteuern von Spirituosen weltweit reproduzier- und vergleichbare Ergebnisse der Ethanol-Gehaltsbestimmung verschiedener Verfahren unentbehrlich [102]. Hinsichtlich dieser beiden Anwendungen wurde die BAM und das LGC vom CCQM mit der gemeinsamen Organisation eines internationalen Ringversuchs (CCQM-P35) beauftragt. Hierbei sollte der Ethanol-Gehalt einer forensischen und einer kommerziellen Probe (Wein mit einem relativen Ethanolgehalt von ca. 10 %), beide vom LGC zur Verfügung gestellt, bestimmt werden. Die Betreuung des Ringversuch – für alle Methoden offen – erfolgte für die NMR-Methoden durch das Labor I.31 der BAM und für alle anderen Methoden durch das LGC. Insgesamt nahmen zehn Nationale Metrologieinstitute (1: LNE (Frankreich) , 2: BAM (Deutschland), 3: VNIIM (Russland), 4: NRC (Kanada), 5: LGC (Großbritannien), 8: NMIJ (Japan), 9: KRISS (Korea), 10: NRCCRM (China), 11: NIST (USA), 12: DSM (Niederlande)) am Ringversuch teil. Es wird in dieser Arbeit jedoch nur auf die NMR-Analysenergebnisse eingegangen.

#### 7.3.1 Messvorschrift

Jeder Ringversuchsteilnehmer erhielt zwei Vials pro Probe (forensisch, Wein). Nach der Versuchsvorschrift waren von jedem Vial zwei Aliquots einzuwiegen, von denen wiederum je

zwei Messungen durchgeführt werden sollten. Aus diesen insgesamt acht Messergebnissen waren der Schätzwert sowie die kombinierte als auch die erweiterte Messunsicherheit nach GUM [11] zu berechnen. Zusätzlich zu dieser allgemeinen Vorschrift der Messprozedur erhielten die Teilnehmer mit NMR-Methoden eine NMR-spezifische Arbeitsanweisung sowie 4 ml der im Kapitel 7.1 referenzierten TSP-Standardlösung zugesandt. Nach dieser Arbeitsanweisung waren zur Analyse der forensischen Probe ca. 125 mg der TSP-Standardlösung und ca. 1000 mg Analytlösung einzuwiegen; entsprechend für die Weinprobe 500 mg der TSP-Standardlösung und 200 mg der Weinprobe. Die Spektrenaufnahme sollte mit dem beigefügten Pulsprogramm (pg-Presaturation zur Wasserunterdrückung) und den in Tabelle 7.7 aufgeführten Parametern zur Aufnahme und Prozessierung erfolgen.

Tabelle 7.7: Vorgeschriebene Parameter zur Aufnahme und Prozessierung der Spektren beim internationalen Ringversuch CCQM-P35.

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anregungsimpulse	90°	Relaxationsintervall	60 s
Anzahl der Datenpunkte	32 k	Länge des Sättigungsimpulses	1,5 s
Spektrenweite	16 ppm	Filterweite	> 20 ppm
Anzahl der Spektrenpunkte	32 k	Line broadening	0,3 Hz
S/N	> 150	Integrationsfaktor	64

Die Phasen- und Grundlinienkorrekturen waren sorgfältig auszuführen und das CH<sub>3</sub>-Signal des Ethanol bei 1,18 ppm gegen das des internen Standards TSP bei 0 ppm auszuwerten. Zusätzlich mussten bei der Weinprobe die Intensitäten der im Integrationsbereich des Ethanol liegenden Fremdsignale bestimmt und von der Gesamtintensität des Ethanol-signals subtrahiert werden.

### 7.3.2 Auswertung

Die eigene Auswertung der beiden Analysenproben erfolgte entsprechend der Ringversuchsmessvorschrift. Die Einwaagen wurde in einem 5 ml Stehkolben durchgeführt, der nur zur Hälfte gefüllt wurde. Gelegentliches Schwenken des Stehkolbens über einen Zeitraum von 90 min führte zur Homogenisierung der Lösungen.

#### 7.3.2.1 Forensische Probe

Die eigenen Analysenergebnisse der acht Messungen sind in der Tabelle 7.8 aufgeführt. Der Schätzwert dieser acht Messungen gab den Ethanol-Gehalt der forensischen Probe mit 1,053 mg g<sup>-1</sup> und einer Standardunsicherheit von 0,004 mg g<sup>-1</sup> wieder.

Tabelle 7.8: Internationaler Ringversuch CCQM-P35, forensische Probe. Einwaagen und ermittelte Ethanol-Gehalte der eigenen Analyse.

		Vial 1				Vial 2			
		Aliquot 11		Aliquot 12		Aliquot 21		Aliquot 22	
		Exp. 111	Exp. 112	Exp. 121	Exp. 122	Exp. 211	Exp. 212	Exp. 221	Exp. 222
$m_i$	TSP	122,4		153,3		128,7		137,7	
in mg	Probe	1001,4		990,3		1040,9		1024,7	
Gehalt in $\text{mg g}^{-1}$		1,053	1,054	1,058	1,055	1,038	1,034	1,066	1,063

In Tabelle 7.9 sind die nach dem im Kapitel 7.1.3 beschriebenen Verfahren der Unsicherheitsberechnung ermittelten Unsicherheitsbeiträge und die daraus berechnete kombinierte Standardunsicherheit aufgeführt. Letztere wurde für das hier angewendete Analysenverfahren zu  $u_c(y) = \pm 0,005 \text{ mg g}^{-1}$  bestimmt. Die erweiterte Unsicherheit berechnete sich bei einem Konfidenzniveau von  $p = 95 \%$  und einem Erweiterungsfaktor  $k = 2$  ( $f_{\text{eff}} = 17$ ) zu  $U = \pm 0,010 \text{ mg g}^{-1}$ .

Tabelle 7.9: Unsicherheitsbudget der Ethanol-Gehaltsbestimmung von der forensischen Probe des internationalen Ringversuchs CCQM-P35.

Unsicherheitsbeitrag	$x_i$	$u(x_i)$	$\frac{u(x_i)}{\bar{x}_i}$	$f_i$
Integration	1,053	0,004	0,4 %	7
Molmasse Ethanol	$46,0684 \text{ g mol}^{-1}$	$0,0017 \text{ g mol}^{-1}$	0,004 %	50
Molmasse TSP	$172,269 \text{ g mol}^{-1}$	$0,005 \text{ g mol}^{-1}$	0,003 %	50
Einwaage forensische Probe	1001,4 mg	0,2 mg	0,02 %	1000
Einwaage TSP-Standardlösung	122,4 mg	0,2 mg	0,16 %	1000
TSP-Gehalt der Stammlösung	$9,109 \text{ mg g}^{-1}$	$0,014 \text{ mg g}^{-1}$	0,15 %	37
Komb. Standardunsicherheit $u_c(y)$		$0,005 \text{ mg g}^{-1}$	0,5 %	17

In der Abbildung 7.12 sind die eingesandten Ergebnisse der Ringversuchsteilnehmer für die forensische Probe dargestellt. Die tabellarische Auflistung der Analysenergebnisse aller Teilnehmer erfolgt im Anhang, Tabelle 11.6. Zur deutlichen Unterscheidung wurden die Analysenergebnisse der NMR-Methoden schwarz und die der anderen Methoden rot markiert. Der gravimetrische Referenzwert des Ethanol-Gehalts wurde vom LGC zu  $1,072 \text{ mg g}^{-1}$  mit einer erweiterten Unsicherheit ( $p = 95 \%$ ) von  $U = \pm 0,006 \text{ mg g}^{-1}$  angegeben.

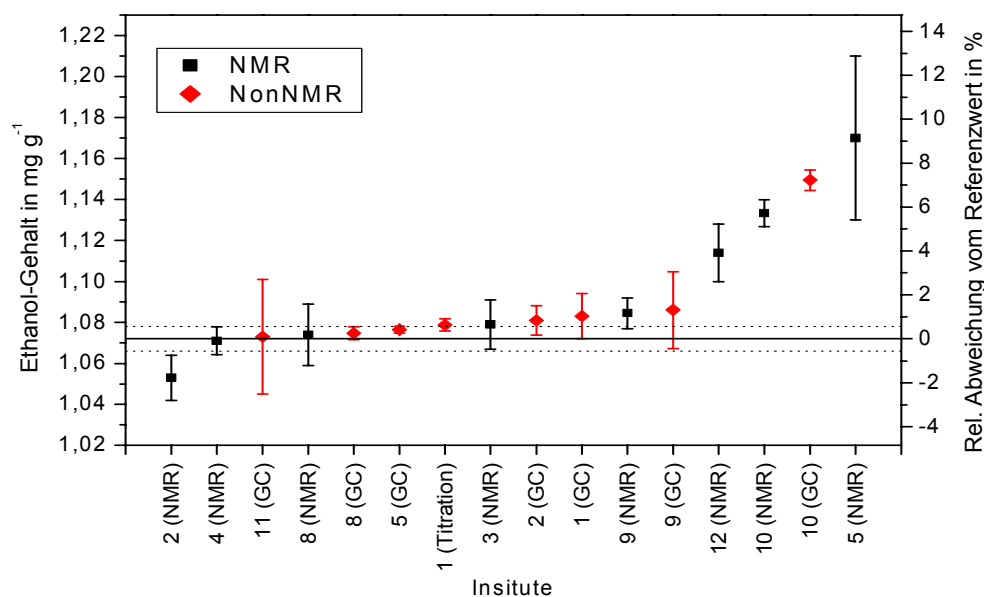


Abbildung 7.12: Internationaler Ringversuch CCQM-P35 (forensische Probe). Analysenergebnisse der Teilnehmer (Unsicherheitsbalken geben die erweiterte Unsicherheiten wieder). Schwarz: Ergebnisse von NMR-Methoden; Rot: Ergebnisse anderer Methoden (Non-NMR).

Von den insgesamt acht eingesandten NMR-Ergebnissen zeigten drei signifikant positive Abweichungen (Institute 5, 10 und 12), die von der Versuchsvorschrift abweichend das Original-Bruker-Pulsprogramms einsetzten. Die Einstrahlung des Vorsättigungsimpulses über eine Dauer von 60 s, wie im Bruker-Pulsprogramm bei  $D1 = 60$  s festgelegt, induziert einen positiven NOE-Effekt auf das auszuwertende  $\text{CH}_3$ -Ethanol-Signal (Kapitel 7.2.4.1.1) und führt somit zu einem zu großen Ethanol-Gehalt als Messergebnis. Das eigene Analysenergebnis (Institut 2) gab den Ethanol-Gehalt der Probe um 1,6 % relativ zu gering wieder, verursacht durch die Verdampfung des Ethanol während der Probenpräparation. Aufbauend auf den Erfahrungen der Fachgruppe I.2 beim Umgang mit wässrigen Ethanol-Lösungen wurde eine Prozedur der Probenpräparation (schnelle Einwägprozedur, vollständig gefüllte und gut abgedichtete Probengefäße) erarbeitet (Arbeitsanweisung im Kapitel 7.2.6.1). Erneute Analysen nach dieser Arbeitsanweisung der Probenpräparation ergaben mit der TSP-Standardlösung (118,9 mg TSP-Standardlösung und 992,3 mg der forensischen Probe) ein Gehalt von  $1,069 \text{ mg g}^{-1}$  und mit Maleinsäure (Kapitel 6.1.1) als internem Standard (99,9 mg Maleinsäure und 25123,4 mg der forensischen Probe) ein Gehalt von  $1,073 \text{ mg g}^{-1}$ . Beide Analysenwerte weichen vom gravimetrischen Referenzwert um weniger als 0,5 % ab. Die Richtigkeit der Analysenergebnisse der vier Institute 3, 4, 8 und 9 bezüglich des Referenzwerts lagen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der GC- und Titrationsmethoden.

### 7.3.2.2 Weinanalyse

Die eigene Auswertung der kommerziellen Probe (Weißwein) erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Intensität des Ethanolsignals inklusive der Fremdsignale bestimmt. Anschließend erfolgte eine Grundlinienkorrektur zur Auswertung der signifikanten Fremdsignale. Die Differenz aus diesen beiden Intensitäten gab die Intensität des Ethanols wieder. Das so ausgewertete  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist in der Abbildung 7.13 dargestellt.

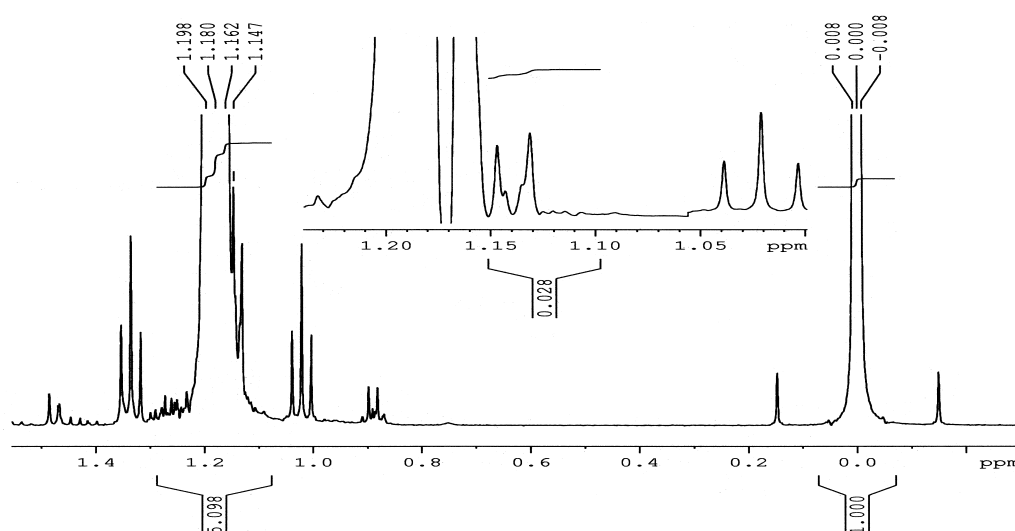


Abbildung 7.13: Internationaler Ringversuch CCQM-P35.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Weinprobe. Auswertung des Ethanolsignals bei 1,18 ppm inkl. Fremdsignal. Anschließend Grundlinienkorrektur zur Auswertung der intensiven Fremdsignale. Differenz der beiden Intensitäten gibt die Intensität des Ethanols wieder.

Aus den acht Analysenergebnissen der eigenen Auswertung (Tabelle 7.10) wurde der Ethanol-Gehalt zu  $96,2 \text{ mg g}^{-1}$  mit einer Standardunsicherheit von  $\pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$  bestimmt.

Tabelle 7.10: Internationaler Ringversuch CCQM-P35, Weinprobe. Einwaagen und ermittelte Ethanol-Gehalte der eigenen Analyse.

		Vial 1				Vial 2			
		Aliquot 11		Aliquot 12		Aliquot 21		Aliquot 22	
		Exp. 111	Exp. 112	Exp. 121	Exp. 122	Exp. 211	Exp. 212	Exp. 221	Exp. 222
$m_i$ in	TSP	510,8		526,4		509,9		587,7	
mg	Probe	194,4		206,5		203,1		199,4	
Gehalt in $\text{mg g}^{-1}$		97,36	97,32	96,84	97,13	95,70	95,76	94,95	94,64

Die kombinierten Standardunsicherheit berechnete sich nach dem im Kapitel 7.1.3 dargestellten Verfahren. Die einzelnen Unsicherheitsbeiträge und die daraus ermittelte kombinierte Standardunsicherheit von  $u_c(y) = 0,5 \text{ mg g}^{-1}$  sind in der Tabelle 7.11 aufgeführt.



Tabelle 7.11: Unsicherheitsbudget der Ethanol-Gehaltsbestimmung von der Weinprobe des internationalen Ringversuchs CCQM-P35.

Unsicherheitsbeitrag	$x_i$	$u(x_i)$	$\frac{u(x_i)}{\bar{x}_i}$	$f_i$
Integration	96,2	0,4	0,4 %	7
Molmasse Ethanol	46,0684 g mol <sup>-1</sup>	0,0017 g mol <sup>-1</sup>	0,004 %	50
Molmasse TSP	172,269 g mol <sup>-1</sup>	0,005 g mol <sup>-1</sup>	0,003 %	50
Einwaage Weinprobe	194,4 mg	0,2 mg	0,10 %	1000
Einwaage TSP-Standardlösung	510,8 mg	0,2 mg	0,04 %	1000
TSP-Gehalt der Stammlösung	9,109 mg g <sup>-1</sup>	0,014 mg g <sup>-1</sup>	0,15 %	37
Komb. Standardunsicherheit $u_c(y)$		0,5 mg g <sup>-1</sup>	0,5 %	17

Mit einem Erweiterungsfaktor  $k = 2$ , der bei einem effektiven Freiheitsgrad von  $f_{\text{eff}} = 17$  ein 95%igen Konfidenzintervall schätzt, wurde die erweiterte Unsicherheit zu  $U = 1,0 \text{ mg g}^{-1}$  berechnet.

Parallel zur Darstellung der forensischen Ringversuchsergebnisse (Abbildung 7.12) sind die Teilnehmerergebnisse der Weinanalyse (aufgeführt im Anhang, Tabelle 11.6) zur besseren Unterscheidung in der Abbildung 7.14 schwarz für die NMR-Methoden und rot für die der anderen Methoden (Non-NMR) dargestellt.

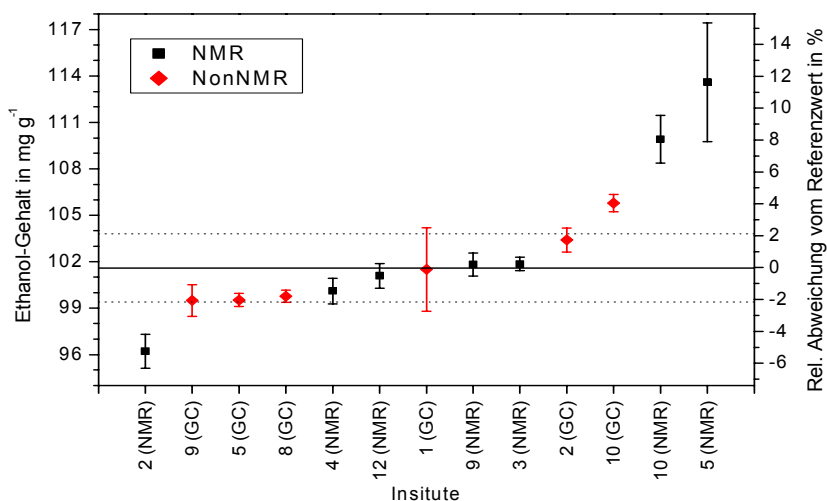


Abbildung 7.14: Internationaler Ringversuch CCQM-P35 (Weinprobe). Analysenergebnisse der Teilnehmer (Unsicherheitsbalken geben die erweiterte Unsicherheiten wieder). Schwarz: Ergebnisse von NMR-Methoden; Rot: Ergebnisse anderer Methoden (Non-NMR). Referenzwert entspricht dem Schätzwert der GC-Analysenergebnisse. Vertrauensbereich gibt die erweiterte Unsicherheit ( $k = 2, 16, p = 95 \%$ ) wieder (Werte von LGC).

Der in der Abbildung 7.14 dargestellte Referenzwert von  $(101,6 \pm 2,2) \text{ mg g}^{-1}$  gibt den Schätzwert der GC-Ergebnisse wieder. Dessen erweiterte Unsicherheit ( $k = 2, 16, p = 95 \%$ )

repräsentiert den Vertrauensbereich (Angabe von LGC). Von den sieben Analysenergebnissen der NMR-Methoden (Institut 8 sandte kein Analysenergebnis des NMR-Verfahrens ein) lagen vier innerhalb des Vertrauensbereiches des Referenzwertes. Das von den Instituten 5 und 10 verwendete, für quantitative Analysen nicht geeignete Pulsprogramm bewirkte wie schon zuvor bei der forensischen Probe positive Abweichungen des Messergebnisses hinsichtlich des Referenzwertes. Die Ursache für den um 6 % relativ zu geringen eigenen Analysenwert (Institut 2) war offenbar analog zur forensischen Probe die Verdampfung des Ethanols während der Homogenisierungsphase (Probenpräparation). Eine erneute Messung (496,7 mg TSP-Standardlösung und 203,9 mg Wein) ergab bei sorgfältiger Probenpräparation einen besser mit dem Referenzwert übereinstimmenden Gehalt von  $99,3 \text{ mg g}^{-1}$ . Die Analyse mit Maleinsäure als internem Standard war wegen Überlagerung mit Resonanzlinien des Weines nicht möglich.

Zusammenfassend erwies sich das aus der Validierung der Presaturation erarbeitete Analysenverfahren mit der quantitativen NMR bei Vorsättigung des Wassersignals im Vergleich mit dem GC-Verfahren bei beiden Proben in der Richtigkeit als gleichwertig. Während bei der Weinprobe beide Verfahren adäquate Präzisionen erreichten, war dagegen das GC-Verfahren bei der forensischen Probe eindeutig präziser. Für die NMR-Methode spricht jedoch die Schnelligkeit und Einfachheit des eingesetzten Verfahrens gegenüber dem GC-Verfahren, da bei letzterem ein hoher Zeit- und Materialaufwand für die erforderlichen Kalibrierungen eingesetzt werden muss [104]. Abweichungen von der Arbeitsanweisung führten zu ungenauen Ergebnissen. Eine Verbesserung der Arbeitsanweisung hinsichtlich der Probenpräparation erwies sich als nötig.

### 7.3.3 Nationaler Ringversuch NMR-3

Mittels eines nationalen Ringversuches (NMR-3) sollte bei Beteiligung von NMR-Laboren aus Industrie, Hochschulen und Forschungsinstitutionen das hier erarbeitete Analysenverfahren zur Bestimmung des Ethanol-Gehalts forensischer Proben zusätzlich bestätigt werden. Abweichend zur Durchführung des internationalen Ringversuches CCQM-P35a wurde zum Vergleich anstelle der TSP-Standardlösung die im Kapitel 6.1.1 referenzierte Maleinsäure als interner Standard verwendet. Ergänzend wurde zur Länge des Vorsättigungsimpulses (1,5 s) die Sättigungsleistung mit 66 dB vorgeschrieben. Dass die Vorgabe des Dämpfungsgrades in dB für die Leistung des Vorsättigungsimpulses keine allgemeingültige Größe ist, sondern von der Gerätekonstellation abhängt, war zum damaligen Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit nicht bekannt. Die nicht eindeutige Vorgabe der Sättigungsleistung sowie die Verwendung der Maleinsäure als internem Standard führten zu einem komplexen Ergebnisbild des Ringversuches, bei dem Abweichungen der Teilnehmerergebnisse zum Referenzwert von bis zu 20 % auftraten. Die Anwendung eines von der Vorschrift abweichenden geringeren Dämpfungsgrads des Vorsättigungsimpulses bei den teilnehmenden Laboratorien musste daher nicht prinzipiell zur partiellen Sättigung des Maleinsäuresignals

führen. Eine eindeutige Zuordnung der ermittelten Einflussgrößen (Verdampfung des Ethanols während der Probenpräparation, partielle Sättigung des Maleinsäuresignals bei zu hoher Sättigungsleistung, induzierte NOE-Effekte auf beide auszuwertenden Signale ( $\text{CH}_3$ -Ethanol, Maleinsäure) bei zu langer Sättigungsdauer) zu den vom Referenzwert abweichenden Teilnehmerergebnissen war nicht immer möglich, da Informationen über die im Teilnehmerlabor durchgeführte Handhabung der Probenpräparation und der Auswertung der Spektren nicht vorlagen. Die in der Analysenvorschrift empfohlene Überprüfung des Analysenverfahrens anhand von Modellproben ist in den meisten Labors der Teilnehmer unterlassen worden. Zudem erschwerte die gegenseitige partielle Kompensation der Auswirkungen bei gleichzeitigem Auftreten mehrerer Einflussgrößen die Auswertung des Ringversuches. Als Fazit des Ringversuches blieben die Erkenntnisse, dass die TSP-Standardlösung der geeignetere interne Standard für dieses Analysenproblem und die Leistung des Sättigungsimpulses nicht als Dämpfungsgrad in dB, sondern als entsprechende Anregungsbreite in Hz vorzugeben ist. Dass die Verwendung von Maleinsäure als internem Standard möglich ist, bewiesen die eigenen Messungen. Die Analyse der NMR-3-Probe nach dem im Kapitel 7.2.6 erarbeiteten Verfahren führte zu einer relativen Abweichung des Analysenergebnisses vom Referenzwert von 0,3 % bei einer relativen Unsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) von 0,5 %.

Die Validierungen der Wasserunterdrückungsmethoden sowie die hier dargestellten Probleme beim NMR-3-Ringversuch wurden auf einem vom Labor I.31 der BAM organisierten Workshop den Teilnehmern vorgetragen und anschließend gemeinsam diskutiert [105].

#### 7.3.4 Messunsicherheit des Analysenverfahrens

Die Messunsicherheit des Analysenverfahrens zur Ethanol-Gehaltsbestimmung wässriger Lösungen mit der  $^1\text{H}$ -NMR bei Anwendung der Presaturation-Technik soll anhand der eigenen Messungen bei den beiden Ringversuche (CCQM-P35, NMR-3) und der gemittelten NMR-Teilnehmerergebnisse des Ringversuchs CCQM-P35 bestimmt werden. Dabei wurden die eigenen Analysenwerte beim Ringversuch CCQM-P35 bei Beibehaltung der Unsicherheit wegen der fehlerhaften Probenpräparation durch die bei sorgfältiger Probenpräparation nachträglich aus je zwei Vergleichsmessungen ermittelten Gehalte ersetzt. Zusätzlich wurden bei der Mittlung der NMR-Analysenergebnisse des Ringversuchs CCQM-P35 die Werte der Institute 5, 10 und 12 wegen Anwendung eines nicht geeigneten Pulsprogramms (Abweichung von der Messvorschrift) ausgeschlossen. Die so aus den kombinierten Standardunsicherheiten, den Abweichungen zu den gravimetrischen Referenzwerten und deren Unsicherheiten nach Gleichung 4.15 berechneten relativen Messunsicherheiten ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) sind in der Tabellen 7.12 dargestellt.

Tabelle 7.12: Fehleranalyse und Bestimmung der relativen Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) des Verfahrens der Gehaltsanalyse wässriger Ethanolösungen anhand der eigenen Ergebnisse (A) der Ringversuche CCQM-P35 und NMR-3 und der gemittelten Teilnehmerergebnisse (B) des Ringversuchs CCQM-P35 (Ausschluss der Institute 5,10 und 12).

Ringversuch	$x_{Ref}$ in $\text{mg g}^{-1}$	$\bar{x}_i$ in $\text{mg g}^{-1}$	$u_c(\bar{x}_i)$ in $\text{mg g}^{-1}$	$ \Delta x_i $ in $\text{mg g}^{-1}$	$2u(\Delta x_i)$ in $\text{mg g}^{-1}$	rel. $U$ in % ( $k=2$ ; $p=95\%$ )
CCQM-P35 (A)	$1,072 \pm 0,006$	$1,069^9$	0,005	0,003	0,016	1,5
forensisch (B)		1,076	0,003	0,004	0,013	1,5
CCQM-P35 (A)	$101,6 \pm 1,0$	$99,3^9$	0,5	2,3	2,2	5
Weinprobe (B)		100,9	0,5	0,7	2,2	2,6
NMR-3	$1,015 \pm 0,005$	1,018	0,002	0,003	0,011	1,2

Die Fehleranalyse der eigenen Analysenwerte als auch die der gemittelten CCQM-P35 NMR-Ergebnisse zeigten keine signifikanten Abweichungen bei der Gehaltsbestimmung wässriger Ethanolösungen bei einem Ethanolgehalt von um die  $1 \text{ mg g}^{-1}$  auf. Die relative Messunsicherheit des Verfahrens ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) wurde jeweils zu 1,5 % bestimmt. Anders sieht es bei der Ethanol-Gehaltsbestimmung der Weinprobe (Ethanolgehalt von ungefähr  $100 \text{ mg g}^{-1}$ ) aus. Die Fehleranalyse der gemittelten CCQM-P35 NMR-Teilnehmerergebnisse lieferte nur eine geringfügige Abweichung zum gravimetrischen Referenzwert und die relative Messunsicherheit des Verfahrens wurde zu unter 3 % bestimmt. Dagegen wurde eine akzeptable Abweichung des eigenen, mit der verbesserten Arbeitsanweisung nachgemessenen Analysenwerts ermittelt, der zu einer höheren Messunsicherheit von 5 % führte.

## 7.4 Zusammenfassung

Für die Gehaltsanalyse mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR wurde eine Arbeitsanweisung ausgearbeitet und an einer Modell-Lösung die Messunsicherheit dieses Verfahrens bestimmt. Ferner wurde erstmalig ein quantitatives Verfahren mit Wasserunterdrückung für die Gehaltsbestimmung wässriger Ethanol-Lösungen erarbeitet. Mittels eines internationalen Ringversuchs (CCQM-P35) wurde die Messunsicherheit des Verfahrens bestimmt und mit hierfür anerkannten Analysenverfahren verglichen. Folgende Erkenntnisse wurden dabei erlangt:

- Für die Gehaltsbestimmung mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR konnte die bei der quantitativen Analyse von Stoffmengenverhältnissen bewährte Arbeitsanweisung übernommen werden. Diese wurde lediglich um die Probenpräparation (Einwaage von zu analysierende Matrix und Standard) erweitert.

<sup>9</sup> Mit der verbesserten Arbeitsanweisung nachgemessener Analysenwert.

- Die Messunsicherheit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR wurde an einer Modell-Lösung aus TSP in  $\text{D}_2\text{O}$  mit ZRM Benzoesäure als internem Standard bestimmt. Die Auswertung der Spektren bei einem S/N von größer 7000 bei Einhaltung eines Integrationsfaktors von 500 führte zu einer relativen Messunsicherheit des Verfahrens ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) von 1,0 %. Dieses Ergebnis stimmte mit den Erkenntnissen aus den Untersuchungen zur Reinheitsbestimmung überein. Somit kann mit einem S/N > 7000 anstelle von 150 und einem größeren Integrationsfaktor von 200 anstatt 64 die relative Messunsicherheit von 1,5 % auf 1,0 % verbessert werden.
- Für die Gehaltsanalyse wässriger Ethanollösungen (0,1 % Ethanol in Wasser) wurden erstmals drei Wasserunterdrückungstechniken (Presaturation, Watergate; LC1WET) bezüglich dem Grad der Wasserunterdrückung, der Güte der Spektrenform, des Unterdrückungsprofils und der Richtigkeit der Intensitätswiedergabe im Spektrum validiert. Alle drei Techniken könne für diese quantitative Aufgabenstellung eingesetzt werden, jedoch eignet sich für den allgemeinen Einsatz die Presaturation-NMR am besten, da sie weder Gradiententechnik noch Kalibrierungen benötigt.
- Die Validierung des Vorsättigungsimpulses der Presaturation-Technik erbrachte als optimale Parameter eine maximale Sättigungsdauer von 1,5 s bei einer Sättigungsleistung, die einer Anregungsbreite des entsprechenden  $90^\circ$ -Impulses von 20 Hz bis 30 Hz entspricht. Längere und stärkere Sättigungsimpulse führen zur besseren Unterdrückung des Wassersignals, verfälschen aber die Intensitäten der auszuwertenden Signale durch partielle Mitsättigung bzw. induzierte NOE-Effekte. Die Angabe der Leistung des Sättigungsimpulses als Dämpfungsgrad in dB ist zu vermeiden, da diese von der Gerätekonstellation und der Skalierung des entsprechenden Geräteherstellers abhängig ist.
- Die relative Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) des Verfahrens der Gehaltsbestimmung bei Anwendung von Wasserunterdrückung mit  $^1\text{H}$ -Presaturation wurde mittels der Teilnehmerergebnisse des Ringversuchs CCQM-P35 und eigener Messungen für wässrige Ethanollösungen mit einem relativen Gehalt von ungefähr 0,1 % (unabhängig vom eingesetzten internen Standard) zu 1,5 % bestimmt (S/N > 150, Integrationsfaktor: 64) und für wässrige Ethanollösungen mit einem relativen Gehalt von ungefähr 10 % (Weinprobe) zu unter 3 %.
- Der enorme Einfluss des Operators auf die Messunsicherheit zeigte sich bei der Probenpräparation. Nur eine sorgfältige Probenpräparation führte zu richtigen Analysenwerten.
- Der Vergleich der NMR-Analysenergebnisse beim internationalen Ringversuch CCQM-P35 mit den Verfahren der GC- und Titration (direkte primäre Methode) zeigte, dass bei beiden Proben das NMR-Verfahren in der Richtigkeit mit den anderen beiden Verfahren gleichwertig ist, bei der Weinprobe auch in der Präzision mit dem GC-Verfahren.
- Entsprechend der Messgleichung gehen in das Unsicherheitsbudget die Unsicherheitsbeiträge der Integration, der beiden Einwaagen der Matrix und des Standards, die Molmassen des Analyten und des Standards und der Reinheitsfaktor des Standards ein.

## 8 Die quantitative NMR als Referenzverfahren

Die Motivation dieser Arbeit war, für den Bereich der organischen Analyse den Einsatz der hochauflösenden Flüssigkeits-NMR in Referenzverfahren für verschiedene Aufgabenbereiche zu untersuchen.

Für den Begriff „Referenzverfahren“ ist in der Literatur keine einheitliche Definition zu finden. Von der Arbeitsgruppe „Referenzverfahren“ in der BAM wurde er wie folgt definiert [106, S. 8]:

Referenzverfahren: Eingehend charakterisiertes und nachweislich beherrschtes Prüf-, Mess- oder Analysenverfahren zur

- (a) Qualitätsbewertung anderer Verfahren für vergleichbare Aufgaben oder
- (b) Charakterisierung von Referenzmaterialien einschließlich Referenzobjekte oder
- (c) Bestimmung von Referenzwerten.

Die Ergebnisunsicherheit eines Referenzverfahrens muss angemessen abgeschätzt und dem Verwendungszweck entsprechend beschaffen sein.

Referenzverfahren werden benötigt, um andere Verfahren zu validieren und Referenzmaterialien zu charakterisieren. Des Weiteren werden sie z.B. bei Gutachten als Grundlage von Prüfungen, Messungen und Analysen eingesetzt. Ein Referenzverfahren qualifiziert sich dadurch, dass es für einen festgelegten Zweck eine ausreichende Ergebnisunsicherheit – ist gleich der Messunsicherheit – aufweist, die nach GUM [11] als Richtigkeit und Präzision angegeben wird. Diese sollten auf das Internationale Einheitensystem (SI) zurückgeführt werden können. Zudem muss das Referenzverfahren von der Zielgruppe akzeptiert werden (siehe auch primäre Methoden, Kapitel 3.1).

Die BAM veröffentlichte 2001 einen Katalog über dort vorhandenen Referenzverfahren [106]. In diesem sind 61 Referenzverfahren für die Prüftechnik und chemische Analytik enthalten. Für organische Analysen werden darin sieben Referenzverfahren aufgezählt, darunter die quantitative  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektroskopie zur relativen Konzentrationsbestimmung von strukturbekannten Gemischen in Lösung.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Anwendungsbereiche der quantitativen NMR-Spektroskopie (Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen, Reinheits- und Gehaltsbestimmung) bearbeitet, bei denen insgesamt drei verschiedene NMR-Techniken ( $^1\text{H}$ -SP-NMR,  $^1\text{H}$ -Wasserunterdrückung (Presaturation), Inverse Gated  $^1\text{H}$ -BB-entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR) eingesetzt wurden. Es wurden dazu systematisch alle physikalischen Parameter sowie entsprechend der aufgestellten Messgleichungen alle Eingangsgrößen auf ihren Einfluss auf die Messunsicherheit untersucht und optimiert. Von der Gerätekonstellation unabhängige Arbeitsanweisungen wurden aufgestellt und schrittweise verbessert. Die

Messunsicherheit der quantitativen NMR wurde für die vier oben genannten Anwendungsbereiche an einfachen, an den Aufgabengebieten des CCQMs orientierten Stoffsystemen ermittelt und mittels nationaler und internationaler Ringversuchen bestätigt. Insgesamt konnte für jedes hier betrachtete Verfahren unter Berücksichtigung der jeweils eingesetzten NMR-Technik

- der Nachweis für vollständige Beschreibung erbracht,
- die Messgleichung in Termen von SI-Einheiten aufgestellt,
- das Unsicherheitsbudget in Termen von SI-Einheiten aufgestellt und
- die metrologische Qualität mit einer relativen Messunsicherheit ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) von 1,5 % ( $S/N > 150$ , Integrationsfaktor: 64) bzw. 1,0 % ( $S/N > 7000$ , Integrationsfaktor: 200) für die  $^1\text{H}$ -NMR und von 2 % für die  $^{13}\text{C}$ -NMR beschrieben werden.

Die Rückführung absoluter Analysenergebnisse erfolgte mittels eines ZRMs. Damit wurde allen bis auf einer in der Definition für das CCQM aufgeführten Anforderungen einer primären relativen Methode entsprochen [12]. Die „[...] highest metrological qualities [...]“ ([12], S. 293) konnte beim Vergleich mit anderen Methoden (GC, Titration, DSC) an den internationalen Ringversuchen des CCQMs (CCQM-P20a, CCQM-P35) der quantitativen NMR-Spektroskopie nicht zugeordnet werden. Zwar konnte die NMR in der Richtigkeit mit den anderen Analyseverfahren mithalten, wies aber generell eine geringere Präzision auf. Die Möglichkeit, die quantitative NMR-Spektroskopie mit der in dieser Arbeit bestimmten Messunsicherheit als relative primäre Methode zu etablieren, besteht in der Analyse von Stoffsystemen, deren Zusammensetzung nur mit den hervorragenden qualitativen Eigenschaften der hochauflösenden NMR-Spektroskopie (Selektivität, Spezifität) voneinander zu unterscheiden sind. Genau hierauf zielt das zukünftige Projekt zur Bestimmung der Reinheitsgrade von Referenzmaterialien im pharmazeutischen Bereich, für das in dieser Arbeit eine Vorstudie durchgeführt wurde (Kapitel 6.1.2)

Ein essentieller Vorteil der NMR-Spektroskopie besteht darin, dass zur Auswertung eines Analyten nur eine eindeutig ihm zugeordnete Resonanzlinie nötig ist. Somit lassen sich auch Stoffsysteme mit komplexeren als den hier betrachteten Spektren quantitativ analysieren, wenn

- diese sich in einem geeigneten Lösungsmittel lösen bzw. verdünnen lassen,
- es sich dabei um strukturbekannte Verbindungen handelt,
- deren Resonanzlinien im Spektrum sich eindeutig zuordnen lassen,
- die Substanzen über den Zeitraum der Analyse sich als stabil erweisen,
- von jeder zu analysierenden Substanz sich mindestens eine Resonanzlinie optimal auswerten (integrieren) lässt und
- für die Reinheits- oder Gehaltsbestimmung ein geeigneter interner Standard (ZRM bzw. auf ein ZRM zurückgeführter Standard) eingesetzt werden kann.

Die in dieser Arbeit erarbeiteten Arbeitsanweisungen und substanzspezifischen Aussagen hinsichtlich der Metrologie können daher generell auf alle Substanzen und Mehrkomponentengemische verallgemeinert werden, sofern obige Bedingungen für die Auswertung eingehalten werden. Sollte die Auswertung mit der quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR nicht möglich sein, so kann die quantitative Inverse Gated  $^1\text{H}$ -BB-entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR eingesetzt werden, jedoch mit einer größeren Messunsicherheit des Analysenverfahrens. Somit ist die quantitative NMR-Spektroskopie wegen ihrer generellen Eigenschaften einer primären relativen Methode, des allgemeinen Einsatzbereiches unter oben genannten Bedingungen und ihrer herausragenden qualitativen Eigenschaften betreffs Selektivität und Spezifität als Referenzverfahren in der organischen Analyse prädestiniert.

Entsprechend der Definition sind Referenzverfahren in ihrem Prüfbereich, ihrer Messunsicherheit und des Einsatzgebietes zu beschreiben. Die untersuchten NMR-Verfahren können in vier verschiedenen Referenzverfahren gegliedert werden, die nun diskutiert werden.

### **8.1 Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen in Mehrkomponentengemischen mittels $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie**

Speziell in der Stereo- und Synthesechemie ist es oftmals wichtig, das Verhältnis zweier Stereoisomere oder den Anteil verschiedener Komponenten in einem Gemisch zu kennen. Wegen der hervorragenden selektiven Eigenschaften der NMR-Spektroskopie eignet sich gerade die quantitative NMR dazu, hier als Referenzverfahren eingesetzt zu werden. Anhand der im Kapitel 5 beschriebenen Untersuchungen konnte mit der im Kapitel 5.1.2 erarbeiteten Arbeitsanweisung für die quantitative  $^1\text{H}$ -SP-NMR bei der Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen bzw. -anteilen der enthaltenden Komponenten einer Fünf-Komponentenlösung eine relative Messunsicherheit von 1,5 % erreicht werden. Der Prüfbereich lag dabei zwischen  $0,004 \text{ mol mol}^{-1}$  und  $0,999 \text{ mol mol}^{-1}$ . Lediglich bei NMR-Geräten, die mit Analogfiltern arbeiteten, ist abweichend von den Parametern in Tabelle 5.1 die Spektrenweite auf mindestens 15 ppm und die Filterweite auf mindestens 30 ppm zu setzen. Entsprechend der Messgleichung wird die Unsicherheit des Analysenwertes nur durch die Standardunsicherheit der Integration dargestellt, da keine aufwendige Probenpräparation nötig ist. In das Unsicherheitsbudget der Messunsicherheit vom Verfahren werden zusätzlich die Abweichung und die Unsicherheit des Referenzwertes eingerechnet. Diese Erkenntnisse sind auf beliebige Mehrkomponentengemische in flüssiger Phase übertragbar, sofern diese die oben genannten Bedingungen erfüllen. Als Einsatzgebiete bieten sich die Validierung anderer Messverfahren zur Bestimmung von Mehrkomponentengemischen und die Zertifizierung von Referenzmaterialien für die organische Analyse an.



## 8.2 Reinheitsbestimmung von organischen Verbindungen mittels $^1\text{H}$ - oder $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Die Reinheitsbestimmung von Referenzmaterialien spielt u.a. im pharmazeutischen Bereich eine große Rolle (Kapitel 6.1.2). Zur Rückführung der Ergebnisse auf die SI-Einheiten wurde ein ZRM als interner Standard eingesetzt. Die mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR erfolgten Reinheitsbestimmungen wurden nach der im Kapitel 6.1.1.1 erarbeiteten Arbeitsanweisung durchgeführt. Die einzelnen Unsicherheitsbeiträge und deren Einfluss auf die Messunsicherheit des Verfahrens sind in der Tabelle 8.1 aufgelistet.

Tabelle 8.1: Unsicherheitsbeiträge und deren Einfluss auf die Messunsicherheit des Verfahrens zur Reinheitsbestimmung mit der quantitativen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR (--: nicht bekannt).

	Rel. Unsicherheit in %			Grad des Einflusses
	$^1\text{H}$ -NMR Integrationsfaktor von		$^{13}\text{C}$ -NMR (o-Xylol)	
	64 (Loganin)	200 (Maleinsäure)		
Integration	0,16	0,05	0,4	hoch
Molmasse Analyt	0,004	0,003	0,006	gering
Molmasse Standard	0,005	0,005	0,006	gering
Einwaage Analyt	0,4	0,09	0,29	hoch
Einwaage Standard	0,7	0,09	0,4	hoch
Reinheitsgrad	0,0012	0,0012	0,12	gering
Komb. Standardunsicherheit	0,8	0,14	0,5	
Abweichung (Analyse - Referenz)	--	0,4	0,4	hoch
Referenzwert	--	0,3	0,3	hoch
Messunsicherheit ( $k=2$ ; $p=95\%$ )	1,6	1,0	1,3	

Aus dieser Tabelle ist deutlich zu entnehmen, dass die Unsicherheit des Analysenergebnisses (kombinierte Standardunsicherheit) im wesentlichen nur durch die Unsicherheitsbeiträge der Integration (Auswertung) und der beiden Einwaagen von Analyt und Standard geprägt wird. Bei einer der Einwaagemenge angepassten Waage mit geringer Einwaageunsicherheit kann der Einfluss der beiden Einwaagen-Unsicherheitsbeiträge im Unsicherheitsbudget verringert werden. Als hauptsächlich sich auswirkende Unsicherheitsgröße fällt dann nur noch die der Integration an. Bei der Messunsicherheit des Verfahrens zeigten die Unsicherheit des Referenzwertes und die Abweichung des Analysenwertes vom Referenzwert einen beachtlichen Einfluss. Ein genauerer Referenzwert würde auch hier zur Herabsetzung der Messunsicherheit des Verfahrens beitragen. Dieser war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zu erhalten.

Wie bei der Reinheitsanalyse des Loganins (Kapitel 6.1.2) gezeigt, kann mit der quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR bei sorgfältiger Spektrenkorrektur und Integration mit einem Integrationsfaktor von 64 eine relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) zwischen 0,8 % und 1,6 % (zu geringe Substanzmenge) erreicht werden. Am System der Reinheitsbestimmung von der Maleinsäure (Kapitel 6.1.1) wurde bei der Auswertung mit einem Integrationsfaktor von 200 eine geringere relative Messunsicherheit ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) von 1,0 % erhalten. Für Stoffsysteme, die mit der  $^1\text{H}$ -NMR nicht zu analysieren waren, wurde die Reinheitsbestimmung mit der  $^{13}\text{C}$ -NMR nach der im Kapitel 6.2.2.1 erarbeiteten Arbeitsanweisung durchgeführt. Dabei konnten relative Messunsicherheiten im Bereich von 1,3 % (TBT-Cl im Rahmen des CCQM-P20a) bis 2 % (Xylol) ermittelt werden. Die Obergrenze des Prüfbereiches der Reinheitsanalyse wird durch dessen Messunsicherheit bestimmt [52]. So können mit der  $^1\text{H}$ -NMR grundsätzlich Substanzen mit einem Reinheitsgrad von bis zu 99 g/g % und mit der  $^{13}\text{C}$ -NMR bis 98 g/g % analysiert werden. Wichtig ist dabei die Rückführung des Ergebnisses auf die SI-Einheiten, die nur über ein ZRM bzw. einen auf ein ZRM zurückgeführten Standard erfolgen kann. Als Einsatzgebiete kommen die Validierung anderer Verfahren sowie die Zertifizierung von Referenzmaterialien für den gesamten organischen Bereich in Frage, speziell bei Substanzen mit Reinheitsgraden im technischen Bereich. Für die Analyse von Reinstsubstanzen mit Reinheitsgraden größer 99,9 % kann dieses Verfahren nicht als Referenzverfahren eingesetzt werden.

### 8.3 Gehaltsbestimmung von organischen Verbindungen mittels $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Die Gehaltsbestimmung ist im gesamten analytischen Bereich von großer Bedeutung. Vor allem zur Charakterisierung von Referenzmaterialien ist die Kenntnis über die genaue Zusammensetzung wichtig. Bei der Gehaltsanalyse von TSP in  $\text{D}_2\text{O}$  mit ZRM Benzoesäure als internem Standard konnte bei einem Integrationsfaktor von 200 eine relative Messunsicherheit des Verfahrens ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ) von 1,0 % erreicht werden. Aus der Auftragung der einzelnen Unsicherheitsbeiträge ins Unsicherheitsbudget der Gehaltsbestimmung in der Tabelle 8.2 ist ersichtlich, dass die Unsicherheitsbeiträge der Molmassen (Analyt, Standard) und des Reinheitsfaktors vom Standards im Vergleich zu denen der anderen Einflussgrößen vernachlässigbar gering sind. Die bei der Gehaltsbestimmung des TSP ermittelte relative Messunsicherheit von 1,0 % gilt nur bei Auswertung der Spektren mit einem Integrationsfaktor von 200. Bezugnehmend auf die Erkenntnisse aus den Kapiteln 5 (Stoffmengenverhältnisse) und 6.1.2 (Reinheitsbestimmung von Loganin) ist bei Auswertung mit einem Integrationsfaktor von 64 mit einer relativen Messunsicherheit von 1,5 % zu rechnen. Der Gehalt des untersuchten Systems lag bei ungefähr  $9\text{ mg g}^{-1}$  und soll als untere Grenze des Prüfbereiches festgelegt werden. Höhere Gehalte sollten aufgrund der Vereinfachung des Analysensystems sich nicht negativ auf die Messunsicherheit auswirken.

Die Obergrenze des Prüfbereiches wird durch die Messunsicherheit des Verfahrens festgelegt [52]. Somit wurde der Prüfbereich zu  $9 \text{ mg g}^{-1}$  bis  $990 \text{ mg g}^{-1}$  definiert.

Tabelle 8.2: Unsicherheitsbeiträge und deren Einfluss auf die Messunsicherheit des Verfahrens zur Gehaltsbestimmung mit der quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR.

	Rel. Unsicherheit in % Integrationsfaktor von 200 (TSP)	Grad des Einflusses
Integration	0,11	hoch
Molmasse Analyt	0,003	gering
Molmasse Standard	0,005	gering
Einwaage Analyt	0,02	gering
Einwaage Standard	0,10	hoch
Reinheitsgrad	0,0012	gering
Komb. Standardunsicherheit	0,15	
Abweichung (Analyse - Referenz)	0,18	hoch
Referenzwert	0,4	hoch
Messunsicherheit ( $k = 2$ ; $p = 95 \%$ )	1,0	

Grundsätzlich kann hier die quantitative  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektroskopie zur Validierung anderer Verfahren und zur Referenzierung von ZRM eingesetzt werden.

#### 8.4 Gehaltsbestimmung in wässriger Matrix mit der NMR-Spektroskopie unter Einsatz der Wasserunterdrückungstechnik (hier: Ethanol)

Speziell im Bereich der Umweltanalytik und der Medizin liegen oftmals wässrige Proben vor, in denen ein Analyt mit geringem Gehalt zu analysieren ist. Es zeigte sich, dass aufgrund des intensiven und breiten Wassersignals im NMR-Spektrum eine quantitative Auswertung mit der einfachen  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Technik nicht mit einer geringen Messunsicherheit machbar ist. Generell stehen hierfür eine Vielzahl an Wasserunterdrückungstechniken zur Verfügung, deren quantitativer Einsatz jedoch kaum in der Literatur beschrieben wird, schon gar nicht mit der hier geforderten metrologischen Qualität. Am Beispiel der Gehaltsbestimmung wässriger Ethanollösungen für die forensische Chemie (relativer Gehalt von ca. 0,1 %) wurde eine Arbeitsvorschrift für die NMR-Presaturation-Technik (selektive Vorsättigung des Wassersignals) entwickelt. Die Darstellung des Einflusses der einzelnen Unsicherheitsbeiträge in die Messunsicherheit des Verfahrens in Tabelle 8.3 zeigt, dass auch hier überwiegend die Beiträge der Integration, des Referenzwertes und der Abweichung des Analysenwertes die Gesamtunsicherheit prägen. Die Unsicherheiten der beiden Einwaagen und des Standards zeigen nur einen mittleren und die der Molmassen einen zu vernachlässigen Einfluss.

Tabelle 8.3: Unsicherheitsbeiträge und deren Einfluss auf die Messunsicherheit des Verfahrens zur Gehaltsbestimmung mit der quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR.

	Rel. Unsicherheit in %		Grad des Einflusses
	0,1 % Ethanol	10 % Ethanol	
Integration	0,4	0,4	hoch
Molmasse Analyt	0,004	0,004	gering
Molmasse Standard	0,003	0,003	gering
Einwaage Analyt	0,02	0,1	mittel
Einwaage Standard	0,16	0,04	mittel
Gehalt des Standards	0,15	0,15	mittel
Komb. Standardunsicherheit	0,5	0,5	
Abweichung (Analyse - Referenz)	0,3	0,7	hoch
Referenzwert	0,6	1,0	hoch
Messunsicherheit ( $k = 2$ ; $p = 95 \%$ )	1,5	2,6	

Der Prüfbereich ist aufgrund der untersuchten Ethanolgehalte auf Gehalte im Bereich von  $1,0 \text{ mg g}^{-1}$  bis  $150 \text{ mg g}^{-1}$  festzulegen, und die relative Messunsicherheit dementsprechend auf 1,5 % bis 2,6 %. Die hierbei erhaltenden Erkenntnisse sind grundsätzlich auch auf andere wässrige Systeme übertragbar. Dabei ist zu beachten, dass die auszuwertenden Signale nicht zu nahe am Wassersignal liegen und somit partiell mitgesättigt werden.

An der BAM existiert bereits ein Referenzverfahren zur Präzisionsbestimmung des Ethanolgehaltes in Wasser. Eine Eingliederung in dieses Referenzverfahren wäre vorstellbar. Als Verwendungszweck sind auch hier Validierung von anderen Methoden sowie Teilnahme an Zertifizierungen von Referenzmaterialien realisierbar.

Zusammenfassend wurden bei allen vier hier diskutierten Referenzverfahren die Prüfbereiche, deren Ergebnisgenauigkeit sowie die Einsatzgebiete dargestellt. Somit steht einer Aufnahme dieser vier Referenzverfahren in den BAM-Katalog sowie in den CMC-Katalog des BIPM nichts entgegen.

## 9 Zusammenfassung

Die Motivation der vorliegenden Arbeit bestand darin zu zeigen, dass die hochauflösende quantitative Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie eine relative primäre Methode ist und als Referenzverfahren eingesetzt werden kann.

Es wurden für vier typische Anwendungen der quantitativen NMR (Bestimmung von Stoffmengenverhältnis und -anteil, Reinheits- und Gehaltsbestimmung) jeweils der Nachweis einer vollständigen Beschreibung der Methode bzw. des Verfahrens erbracht, die Messgleichung und das Unsicherheitsbudget in Termen von SI-Einheiten aufgestellt und die Messunsicherheit ermittelt. In letztere gingen generell die kombinierte Standardunsicherheit der Eingangsgrößen, die Unsicherheit des Referenzwertes und die Abweichung des Analysenwertes vom Referenzwert ein.

Aufbauend auf der Validierung der  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Methode (Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen) in der Diplomarbeit [14] wurde eine Arbeitsanweisung für die Aufnahme und Auswertung quantitativer  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Spektren erarbeitet und schrittweise verbessert. Die entscheidenden Elemente dieser Arbeitsanweisung sind die folgenden: Zeitsequenz mindestens 7/3 mal der längsten  $T_1$ -Zeit aller auszuwertenden Signale, Anregung mit einem  $30^\circ$ -Impuls, Aufnahme der Spektren mit 32 k Datenpunkte (bei guter Auflösung gegebenenfalls auf 64 k erhöhen) bei einer Sweepweite von 16 ppm und einer Filterweite von mindestens 30 ppm, ein für alle auszuwertenden Signale erreichtes  $S/N > 150$ , Prozessierung mit vorheriger em-Multiplikation ( $I_b = 0,3 \text{ Hz}$ ) und Zero Filling auf 64 k Spektrenpunkte, sorgfältige manuelle Korrektur der Grundlinie und Phasen im Spektrum, Integrationsgrenzen in Abhängigkeit von der Halbwertsbreite mit einem Faktor von 64 setzen, Integralzug gegebenenfalls mit BIAS und SLOPE zu geraden An- und Ausläufen korrigieren.

Aus den Ergebnissen der Validierungen der einzelnen Methoden und Verfahren sowie der Auswertungen der Ringversuche wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Die eindeutige qualitative Zuordnung der Signale, die Überprüfung der Stabilität und die Auswahl der auszuwertenden Signale (keine Deuterierungseffekte, keine Fremdsignale im Integrationsbereich, Integration mit einem Integrationsfaktor von mindestens 64 möglich) sind die Grundlage für eine quantitative Auswertung.
2. Eine oberflächliche Korrektur der Grundlinie und der Phasen im Spektrum sowie die Nichteinhaltung eines konstanten Integrationsfaktors führt zu erheblichen systematischen Fehlern.
3. Die automatischen Korrektur-Algorithmen der beiden Auswertungsprogramme XWinNMR und MestRe-C liefern unzureichend grundlinien- und phasenkorrigierte Spektren. Die Simulation mit optimierten Lorentz-Gauß-Kurven (Software WinFit) geben die Signale im Spektrum nicht ausreichend genau wieder.

4. Die nicht vollständige Erfassung überlagerter Einzelsignale (hier ETS) mit einem Integral und anschließender Korrektur des Integralzuges bewirkt verfälschte Analyseenergebnissen. Überlagerte Einzelsignale sind daher immer mit einem Integral vollständig zu erfassen. Gegebenenfalls ist dazu der Integrationsbereich zu erweitern.
5. Aus den Punkten 1 bis 4 wird der enorme Einfluss des Operators auf die Messunsicherheit des Verfahren deutlich. Es ist daher eine sorgfältige Arbeitsweise des Operator für quantitative Auswertungen bei folgenden Elemente nötig: Probenpräparation, Korrektur der Spektren bezüglich Grundlinie und Phasen, Auswahl der auszuwertenden Signale, Setzung der Integrationsbereiche (vollständige Erfassung überlagerter Einzelsignale).
6. Bei NMR-Geräten mit Analogfilter-Technik werden Signale im Grenzbereich des Analog-Filters teilweise gesättigt. Die Filtergrenze sollte mindestens mit einem Abstand von 10 ppm zum nächsten Signal gesetzt werden. Bei NMR-Spektrometern mit Oversampling-Technik erübrigt sich dies, da dessen Filterweite automatisch auf maximal mögliche Werte gesetzt werden.
7. Die Unabhängigkeit der Messunsicherheit der Methode von der eingesetzten Magnetfeldstärke sowie die Allgemeingültigkeit der Messvorschrift konnte gezeigt und mit eigenen Vergleichsmessungen an verschiedenen NMR-Spektrometern ( $^1\text{H}$ : 300 MHz, 400 MHz, 500 MHz, 600 MHz, 800 MHz) belegt werden.
8. Der Einsatz von Messköpfen, die nicht speziell für die  $^1\text{H}$ -NMR vorgesehen sind, kann zu einer verfälschten Intensitätswiedergabe im Spektrum führen. Auf deren Einsatz für quantitative Messungen ist daher zu verzichten.
9. Beim Einsatz modernster NMR-Technik (18,8 T Höchstfeldgerät ( $^1\text{H}$ : 800 MHz), Kryo-Messkopf) für quantitative Analysen wurde eine erheblich bessere Empfindlichkeit erreicht, nicht jedoch eine bessere Auflösung. Es muss dabei mit starken Radiation Damping Effekten gerechnet werden.
10. Radiation Damping Effekte wurden schon ab einer Magnetfeldstärke von 9,4 T nachgewiesen und führt generell zur Verbreiterung intensiver Signale. Die Richtigkeit der Intensitätswiedergabe im Spektrum wird davon nicht beeinflusst.
11. Das Aufstellen der Unsicherheitsbudgets erfolgte nach dem vom ISO veröffentlichten Leitfaden zur Ermittlung von Messunsicherheiten. Die kombinierte Standardunsicherheit des Analyseergebnisses umfasst bei der Bestimmung von Relativgrößen (Stoffmengenverhältnis, -anteil) nur den Unsicherheitsbeitrag der Integration (Intensitätsverhältnis Analyt zu Standard). Bei der Analyse von Absolutgrößen (Reinheit, Gehalt) gehen zusätzlich die Unsicherheitsbeiträge der beiden Einwaagen und Molmassen von Analyt und Standard sowie die Reinheit (Reinheitsgrad, Reinheitsfaktor) des Standards mit ein. Der Unsicherheitsbeitrag der Molmassen kann generell vernachlässigt werden. Die Unsicherheitsbeiträge

der Einwaagen und der Reinheit des Standards können bei entsprechender Wahl der Waage hinsichtlich der Einwaagemenge und des einzusetzenden Standards minimiert und gegebenenfalls vernachlässigt werden. Die Messunsicherheit des Verfahrens wurden aus der kombinierten Standardunsicherheit des Analysenergebnisses, der Unsicherheit des Referenzwertes und der systematischen Abweichung des Analysenwertes bezüglich des Referenzwertes berechnet.

12. Die Auswertung der Spektren bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( $S/N$ ) > 150 mit einem Integrationsfaktor von 64 führt generell zu einer relativen Messunsicherheit der Methode bzw. der Verfahren ( $k=2$ ;  $p=95\%$ ) von 1,5 %. Die Auswertung mit einem größeren Integrationsfaktor von 200 bei einem  $S/N > 7000$  führte zur Verbesserung der relativen Messunsicherheit auf 1,0 %.

Im Rahmen der Arbeit wurden die folgenden Einsatzbereiche der quantitativen NMR bearbeitet. Hierzu wurden für spezielle Aufgabenbereiche Multipuls-Techniken validiert:

1. Anhand einer Fünf-Komponentenlösung (Ethyl-4-toluolsulfonat, [2,2]-Paracyclophan, Durol, Cyclododekan und Oktamethylcyclotetrasiloxan) mit einem Stoffmengenanteil von 94 % bzw. 97 % der Hauptkomponente Durol wurde die Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen untersucht. Die relative Messunsicherheit beider Methoden wurde jeweils – bezogen auf die gravimetrischen Referenzwerte – zu 1,5 % bestimmt.
2. Die Messunsicherheit bei der Bestimmung von verschiedenen Stoffmengenverhältnissen überlagerter Signale wurde anhand von Zwei-Komponenten-Lösungen ermittelt. Stoffsysteme mit Überlagerung einiger Signale im Spektrum können über die Differenzbildung (Benzoessäure-Ethylbenzoat) mit einer relativen Messunsicherheit von unter 1,5 % analysiert werden. Stoffsysteme mit Überlagerung aller Signale im Spektrum (unterschiedliche intramolekulare Protonenverhältnisse) können dagegen über ein Gleichungssystem (Ethylbenzoat-Phthalsäurediethylester) mit einer relativen Messunsicherheit von unter 2 % ermittelt werden.
3. Zur Rückführung von Absolutgrößen (Reinheit, Gehalt) auf SI-Einheiten wurde ein ZRM (Benzoessäure) eingesetzt und weitere Standards (Maleinsäure, Durol, 3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz (TSP)-Lösung) als NMR-Referenzmaterialien auf dieses ZRM zurückgeführt. Alle vier Standards zeigten sich als interne Standards geeignet.
4. Die Reinheitsanalyse mit der  $^1\text{H}$ -NMR wurde am System Maleinsäure mit ZRM Benzoessäure als internem Standard untersucht. Bei Anwendung eines Integrationsfaktors von 200 bei einem ( $S/N$ ) > 12000 wurde eine relative Messunsicherheit von 1,0 % erreicht.
5. Für die Reinheitsbestimmung von Referenzmaterialien für den pharmazeutischen Bereich wurde eine Vorstudie durchgeführt. Das Zentralinstitut Arzneimittel-

forschung in Sinzig stellte hierfür drei mögliche Referenzmaterialien zur Verfügung (Spiraeosid, Thymol, Loganin). Mit ZRM Benzoesäure als internem Standard wurde die relative Messunsicherheit des erarbeiteten Verfahrens zu 1,5 % bestimmt. Ein Referenzwert lag nicht vor.

6. Für die Reinheitsbestimmung mit der  $^{13}\text{C}$ -NMR von einem Gemisch der drei Stellungsisomeren Xylole (o-, m- und p-Xylol) einschließlich Ethylbenzol als Konstitutionsisomer sowie von Tributylzinnchlorid wurde die Inverse Gated  $^1\text{H}$ -Breitband-entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR validiert. Für intensitätsrichtige Signalwiedergabe im Spektrum ist die Aufnahmezeit (entspricht der Entkopplungsdauer) auf maximal 3 s zu begrenzen. Die relative Messunsicherheit des Verfahrens wurde anhand der Xylol-Lösung mit Durol als internem Standard bezogen auf die gravimetrischen Referenzwerte zu unter 2 % bestimmt. Die Reinheitsanalyse war mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR aufgrund überlagerter Signale nicht möglich.
7. Mittels der TSP-Standardlösung und dem ZRM Benzoesäure als internem Standard wurde die Messunsicherheit der Gehaltsanalyse mit der  $^1\text{H}$ -SP-NMR bestimmt. Die Setzung der Integrationsbereiche entsprechend einem Integrationsfaktor von 500 bei  $\text{S/N} > 7000$  führte zu einer relativen Messunsicherheit des Verfahrens von 1,0 %.
8. Für die Gehaltsbestimmung wässriger Ethanol-Lösungen mit einem relativen Gehalt von 0,1 % wurde erstmals die Güte der  $^1\text{H}$ -Wasserunterdrückung für quantitative NMR-Spektroskopie analysiert. Dazu wurden drei  $^1\text{H}$ -Wasserunterdrückungstechniken (Presaturation, Watergate, LC1WET) validiert und anhand von vier Kriterien (Grad der Wasserunterdrückung, Güte der Spektrenform, Profil der Unterdrückung, Richtigkeit) miteinander verglichen. Alle drei Unterdrückungstechniken können quantitativ eingesetzt werden, wobei bei Watergate und LC1WET eine Kalibrierung nötig ist. Von den drei Unterdrückungsmethoden kann nur Presaturation, da ohne Gradiententechnik, universell an jedem NMR-Spektrometer betrieben werden. Der Vorsättigungsimpuls ist dabei mit einer Impulslänge von maximal 1,5 s bei einer Impulsleistung, die einem Anregungsbereich von 20 Hz bis 30 Hz entspricht, einzustrahlen. Die Angabe der Impulsleistung als Grad der Dämpfung in dB ist zu vermeiden, da diese weder zwischen Geräten eines Herstellers (abhängig von der Gerätekonstellation) noch zwischen den Geräteherstellern (unterschiedliche dB-Skalierungen) übereinstimmt. Die relative Messunsicherheit des Verfahren bei Wasserunterdrückung mit der  $^1\text{H}$ -Presaturation-Technik wurde bezogen auf den gravimetrischen Referenzwert zu 1,5 % bestimmt



Um die hier ermittelten Messunsicherheiten der quantitativen NMR-Verfahren mit denen anderen Verfahren zu vergleichen, wurden an nationalen und internationalen Ringversuchen teilgenommen und teilweise an der Organisation mitgearbeitet. Aus den Ergebnissen dieser Ringversuche wurden die folgenden Erkenntnisse gezogen:

1. Der Einsatz einer Arbeitsanweisung zur Aufnahme und Auswertung von quantitativen  $^1\text{H}$ -SP-NMR-Messungen bei den Ringversuchen CCQM-P3 und NMR-2 führte im Vergleich zu den vorangegangenen Ringversuchen CCQM-4 und NMR-1 (Messung nach Laborroutine) zur deutlichen Verbesserung der Messunsicherheit bei der Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen. Anhand der noch auftretenden Abweichungen der Teilnehmerergebnisse konnten weitere Einflussgrößen ermittelt werden.
2. Mittels des internationalen Ringversuchs CCQM-P20a zur Reinheitsbestimmung von Tributylzinnchlorid konnte gezeigt werden, dass die quantitative  $^1\text{H}$ -entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR in der Richtigkeit mit den gängigen Analyseverfahren wie GC und DSC gleichwertig ist. Die Präzision war nur geringfügig niedriger.
3. Beim Ringversuch CCQM-P35, Gehaltsbestimmung wässriger Ethanollösung (0,1 % Ethanol in Wasser, Weißwein mit 10 % Ethanol) konnte beim Vergleich mit anerkannten analytischen Verfahren (GC, Titration) gezeigt werden, dass die quantitative NMR bei Einhaltung der validierten Arbeitsanweisung in der Richtigkeit mit den anderen beiden Verfahren gleichwertig ist, bei höheren Ethanolgehalten auch in der Präzision.

Die gewonnenen Erfahrungen und Erkenntnisse, die auf der Bearbeitung aller aufgetretenen Probleme beruhen, wurden an die Teilnehmer der internationalen Ringversuche auf den CCQM-Sitzungen und an die Teilnehmern der nationalen Ringversuche auf vom Labor I.31 (BAM) organisierten Workshops weitergegeben. Damit wurde der Multiplikatorfunktion der BAM zur Weitergabe von Prinzip und Prozedur der metrologischen Rückführung an NMR-Mess- und Forschungsinstitutionen nachgekommen.

Die Bewertung dieser vier quantitativen NMR-Anwendungen führte zu dem Ergebnis, dass die quantitative NMR-Spektroskopie in den hier erarbeiteten Verfahren im wesentlichen der Definition einer relativen primären Methode entspricht.

Die ausführliche Diskussion der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse führte zur Verallgemeinerung der Verfahren für komplexere Stoffsysteme als die hier bearbeiteten. Dazu waren Randbedingungen (Prüfbereich, Ergebnisunsicherheit, Einsatzgebiete) für die einzelnen Verfahren festzulegen, um sie als Referenzverfahren einzusetzen. Die folgenden Referenzverfahren werden definiert:

1. *Bestimmung von Stoffmengenverhältnissen und -anteilen in Mehrkomponentengemischen mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie:* Der Prüfbereich der zu analysierenden Stoffmengenverhältnisse wurde zu  $0,004 \text{ mol mol}^{-1}$  bis  $0,999 \text{ mol mol}^{-1}$  mit einer charakteristischen Ergebnisunsicherheit von 1,0 % bis 1,5 % bestimmt.
2. *Reinheitsbestimmung von organischen Verbindungen mittels  $^1\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie:* Der Prüfbereich für die Reinheitsanalyse einer Substanz wurde für die  $^1\text{H}$ -NMR mit einer Obergrenze von 99 g/g % bei einer charakteristischen Ergebnisunsicherheit von 1,0 % bis 1,5 % relativ und für die  $^{13}\text{C}$ -NMR mit einer Obergrenze von 98 g/g % bei einer Ergebnisunsicherheit von 2 % relativ bestimmt.
3. *Gehaltsbestimmung von organischen Verbindungen mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie:* Der Prüfbereich des zu analysierenden Mindestgehalts wurde zu  $9 \text{ mg g}^{-1}$  bis  $990 \text{ mg g}^{-1}$  mit einer charakteristischen Ergebnisunsicherheit von 1,0 % bis 1,5 % bestimmt.
4. *Gehaltsbestimmung in wässriger Matrix mit der NMR-Spektroskopie unter Einsatz der Wasserunterdrückungstechnik (hier: Ethanol):* Der Prüfbereich der zu analysierenden Ethanolgehalte wurde zu 0,1 % bis 15 % mit einer charakteristischen relativen Ergebnisunsicherheit von 1,0 % bis 3 % bestimmt.

Als Einsatzgebiete bieten sich für alle vier Referenzverfahren die Validierung anderer Verfahren sowie die Teilnahme an Zertifizierungen organischer Referenzmaterialien und Einträge in den CMC-Katalog des BIPM an.

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Richter, W.: Comparability and recognition of chemical measurement results – an international goal. *Fresen. J. Anal. Chem.* 365, 1999, 569-573.
- [2] Dube, G.: Metrology in chemistry – a public task. *Accredit. Qual. Assur.* 6, 2001, 3-7.
- [3] Zschunke, A.: The role of reference materials. *Accredit. Qual. Assur.* 5, 2000, 441-445.
- [4] Zschunke, A.: Reference Materials in Analytical Chemistry – A Guide for Selection and Use. Springer: Berlin 2000.
- [5] Zschunke, A.: Global comparability of analytical results. *Accredit. Qual. Assur.* 3, 1998, 393-397.
- [6] King, B.: The practical realization of the traceability of chemical measurements standards. *Accredit. Qual. Assur.* 5, 2000, 429-436.
- [7] Hässelbarth, W.: Rückführbarkeit analytischer Messungen. Hrsg.: Bahadir, A.M.; Danzer, K.; Engewald, W.; Fresenius, W.; Galensa, R.; Günzler, H.; Huber, W.; Linscheid, M.; Schwedt, G. und Tölg, G.: *Analytiker Taschenbuch*, Band 19. Springer: Berlin 1998, S. 45-74.
- [8] Maniara, G.; Rajamoorthi, K.; Rajan, S. und Stokton, G.W.: Method Performance and Validation for Quantitative Analysis by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy. Applications to Analytical Standards and Agricultural Chemicals. *Anal. Chem.* 70(23), 1998, 4921-4928.
- [9] Jancke, H.: NMR als primäre analytische Messmethode. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 46 (7/8), 1998, 720-722.
- [10] King, B.: Metrology in chemistry: Part II. Future requirements in Europe. *Accredit. Qual. Assur.* 5, 2000, 266-271.
- [11] ISO: Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen, Deutsche Übersetzung des „Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement“. Hrsg.: DIN Deutsches Institut für Normung e. V.; 1. Auflage. Beuth Verlag GmbH: Berlin u.a. 1995.
- [12] Milton, M.J. und Quinn, T.J.: Primary methods for measurement of amount of substance. *Metrologia* 38(4), 2001, 289-296.
- [13] Internationales Wörterbuch der Metrologie, Deutsche Übersetzung des „International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology“. Hrsg.: DIN Deutsches Institut für Normung e. V., 2. Auflage. Beuth Verlag GmbH: Berlin 1994.
- [14] Malz, F.: Validierung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie als primäre analytische Methode. Diplomarbeit. Technische Universität Berlin 1999.
- [15] Derome, A.E.: Organic Chemistry Series. Hrsg.: Baldwin, J.E., FRS. BD. 1: Modern NMR Techniques for Chemistry Research. Pergamon Press: Oxford u.a. 1987.
- [16] Günther, H.: NMR-Spektroskopie. Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen- und Kohlenstoff-13-Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie. 3., neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag: Stuttgart u.a. 1992.
- [17] Friebolin, H.: Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung. VCH: Weinheim u.a. 1988.

- 
- [18] Levitt, M.H.: Spin Dynamics. Basics of Nuclear Magnetic Resonance. Wiley-VCH-Verlag: Chichester u.a. 2001.
- [19] Freeman, R. : Handbook of Nuclear Magnetic Resonance, 2. Auflage. Addison Wesley Longman, Edinburgh 1997.
- [20] Jancke, H.: Quantitative NMR Spectroscopy - a Review. Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Berlin 1998.
- [21] Quinn, T.J.: Primary methods of measurement and primary standards. Metrologia 34, 1997, 61-65.
- [22] Martin, M.L.; Martin, G.J, und Delpeuch, J.-J.: Practical NMR Spectroscopy. Kapitel 9: Practical Aspects of Intensity Measurement and Quantitative Analysis. Heyden & Son: London 1980.
- [23] Keifer, P.: 90° Pulse Width Calibrations: How to Read a Pulse Width Array. Concept. Magnetic Res. 11(3), 1999, 165-180.
- [24] Szantay jr., C.: High-Field NMR Spectroscopy as an analytical tool for quantitative determinations: pitfalls, limitations and possible solutions. Trend In Analytical Chemistry 11(9), 1992, 332-344.
- [25] Rabenstein, D.L.; Millis, K.K. und Strauss, E.J.: Proton NMR Spectroscopy Of Human Blood Plasma And Red Blood Cells. Anal. Chem. 60(24), 1988, 1380A-1391A.
- [26] Rabenstein, D.L. und Keire, D.A.: Quantitative Chemical Analysis by NMR. Pract. Spectrosc. 11, 1991, 323-369.
- [27] Thiault, B. und Mersseman, M.: Quantitative Analysis by Nuclear Magnetic Resonance with Fourier Transformation. Org. Magn. Reson. 7, 1975, 575-578.
- [28] Bruker: Die digitale NMR-Spektrometerfamilie. NMR Benutzertagung. Ettlingen 1994.
- [29] Lindon, J.C. und Ferrige, A.G.: Digitisation and Data Processing in Fourier Transform NMR. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 14, 1980, 27-66.
- [30] Herzog, W.-D. und Messerschmidt, M.: Die Praxis der instrumentellen Analytik. Hrsg.: Gruber, U. und Klein, W. Band: NMR-Spektroskopie für Anwender. Wiley-VCH-Verlag: Weinheim u.a. 1995.
- [31] Herring, F.G. und Phillips, P.S.: Integration Errors in Digitized Magnetic Resonance Spectra. J. Magn. Reson. 62, 1985, 19-28.
- [32] Grivet, J.-P.: Signal treatment and signal analysis in NMR. Hrsg.: Rutledge, D.N. Kapitel 14: Accuracy and Precision of Intensity Determinations in Quantitative NMR. Elsevier: Amsterdam u.a. 1996.
- [33] Everleigh, L.J.: Signal treatment and signal analysis in NMR. Hrsg.: Rutledge, D.N. Kapitel 1: Fourier Transformation and Signal Manipulation. Elsevier: Amsterdam u.a. 1996.
- [34] McLeod, K. und Comisarow, M.B.: Systematic Errors in the Discrete Integration of FT NMR Spectra. J. Magn. Reson. 84, 1989, 490-500.
- [35] Antoine, J.-P.; Coron, A. und Dereppe, J.-M.: Water Peak Suppression: Time-Frequency vs. Time-Scale Approach. J. Magn. Reson. 144, 2000, 189-194.
- [36] Gueron, M.; Plateau, P. und Decorps, M. : Solvent Signal Suppression in NMR. Progress in NMR Spectroscopy 23, 1991, 135-209.
- [37] Braun, S.; Kalinowski, H.-O. und Berger, S.: 150 and More Basic NMR Experiments. A Practical Course. 2. erweiterte Edition. Wiley-VCH-Verlag: Weinheim u.a. 1998.

- 
- [38] Freeman, R.: Spin Choreography. Basics Steps in High Resolution NMR. Spectrum Academic Publishers: Oxford 1997.
- [39] Süllentrop, F.: Entwicklung und Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden in der Diagnose von Krebserkrankungen. Dissertation. Universität Köln 2001.
- [40] Zhang, S.; Yang, X. und Gorenstein, D.G.: Enhanced Suppression of Residual Water in a "270" WET Sequence. J. Magn. Reson. 143, 2000, 382-386.
- [41] El-Shahed, F.; Doerffel, K. und Radeaglia, R.: Anwendung von Relaxationsreagenzien in der quantitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. J. prakt. Chem. 321(5), 1979, 859-864.
- [42] Mooney, J.R: Analytical NMR. Editor: Field, L.D. und Sternhell, S. Kapitel 3: Quantitative Applications of  $^{13}\text{C}$  NMR. John Wiley Sons: Chichester u.a. 1989.
- [43] Noggle, J.H. und Schirmer, R.E.: The Nuclear Overhauser Effect. Academic Press: London 1971.
- [44] Neuhaus, D. und Williamson, M.: The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis. VCH: New York u.a. 1989.
- [45] Deutscher Kalibrierdienst (DKD): DKD-4. Rückführung von Mess- und Prüfmitteln auf nationale Normale. Deutsche Fassung der Publikation EAL-G12, Edition 1, November 1995, „Traceability of Measuring and Test Equipment to National Standards. Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB): Braunschweig 1998.
- [46] Zschunke, A.: Rückführung chemischer Analysenergebnisse. GIT Labor-Fachzeitschrift 5, 2002, 533.
- [47] Wells, R.J. und Cheung, J.: Quantitative Analysis of Technical Grade Agrochemicals by High Field  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy. The Chemistry Preprint Server CPS: analchem/0103002, 2001.
- [48] Griffiths, L. und Irving, A.M.: Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits. Analyst 123, 1998, 1061-1068.
- [49] Larive, C.K.; Jayawickrama, D. und Orfi, L.: Quantitative Analysis of Peptides with NMR Spectroscopy. Appl. Spectrosc. 51(10), 1997, 1531-1536.
- [50] Akoka, S.; Barantin, L. und Trierweiler, M.: Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. Anal. Chem. 71, 1999, 2554-2557.
- [51] Silvestre, V.; Goupy, S.; Trierweiler, M.; Robins, R. und Akoka, S.: Determination of Substrate and Product Concentrations in Lactic Acid Bacterial Fermentations by Proton NMR Using the ERETIC Method. Anal. Chem. 73, 2001, 1862-1868.
- [52] Noack, S.: Wie rein sind Reinsubstanzen? GIT Fachz. Lab. 8, 1996, 771-775.
- [53] EN ISO/IEC 17025 : Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien. Dreisprachige Fassung. Deutsches Institut für Normungen e.V. : Berlin 2000.
- [54] Kromidas, S.: Validierung in der Analytik. Wiley-VCH: Weinheim u.a. 1999.
- [55] EURACHEM/CITAC: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2. Auflage. Editor: Ellison, S.L.; Rosslein, M. und Williams, A. 2000.
- [56] Ellison, S.L. und Barwick, V.J.: Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation. Part 1. Principles of an approach using cause and effect analysis. Analyst 123, 1998, 1387-1392.
- [57] ISO 9004-4: Total Quality Management Part 2. Guidelines for Quality Improvement. International Standards Organisation. Geneva 1993.

- 
- [58] Rösslein, M.: Messunsicherheit in der Analytischen Chemie – Einführung und Grundlagen. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage. EMPA : St. Gallen 1999.
- [59] Noack, S. und Hässelbarth, W.: Konzept zur Ermittlung und Angabe von Messunsicherheiten in der Abteilung „Analytische Chemie; Referenzmaterialien“. Anlage 1 zu QMH-I-5. Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Berlin 2002.
- [60] Alexander, T.G. und Koch, S.A.: Nuclear Magnetic Resonance Methods for the Analysis of Pharmaceuticals. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists. 50(3), 1967, 676-678.
- [61] Bauer, M.; Bertario, A.; Boccardi, G.; Fontaine, X.; Rao, R. und Verrier, D: Reproducibility of  $^1\text{H}$ -NMR integrals: a collaborative study. J. Pharm. Biomed. Anal. 17, 1997, 419-423.
- [62] Jancke, H und Malz, F.: Abschlussbericht NMR-1. Berlin 1999.
- [63] Jancke, H und Malz, F.: International Comparison CCQM-4. Final Report. Berlin 1999.
- [64] Malz, F. und Jancke, H.: Abschlussbericht Ringversuch NMR-2. Berlin 2000.
- [65] Jancke, H. und Malz, F.: Draft report CCQM-P3. Berlin 2000.
- [66] Cobas, C.; Cruces, J. und Sardina, F.J.: MestRe-C 2.1. Universidad de Santiago de Compostela. <http://qobruue.usc.es/jsgroup/MestRe-C/MestRe-C.html>.
- [67] Augner, S.: Beiträge zur quantitativen Analytik mit Hilfe von spektroskopischen Methoden. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität. Düsseldorf 1999
- [68] Bloembergen, N. und Pound, R.V.: Radiation Damping in Magnetic Resonance Experiments. Phys. Rev. 95(8), 1954, 8-12.
- [69] Mao, X.-A. und Ye, C.-H.: Understanding Radiation Damping in a Simply Way. Concept. Magnetic Res. 9, 1997, 173-187.
- [70] Abragam, A.: The Principles of Nuclear Magnetism. The International Series of Monographs on Physics, Hrsg.: Mott, N.F.; Bullard, E.C. und Wilkinson, D.H. Oxford University Press: Glasgow u.a. 1961.
- [71] Bruce, C.R.; Norberg, R.E. und Pake, R.V.: Radiation Damping and Resonance Shapes in High Resolution Nuclear Magnetic Resonance. Phys. Rev. 104, 1956, 419-420.
- [72] Bloom, S.: Effects of Radiation Damping on Spin Dynamics. J. Appl. Phys. 28, 1957, 800-805.
- [73] Mao, X. und Chen, J.: Radiation damping effects in solvent preirradiation experiments in NMR. Chem. Phys. 202, 1996, 357-366.
- [74] Jancke, H. und Malz, F.: Bericht zum Workshop NMR-2 am 10.10.2000 in der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM). Berlin 2000.
- [75] Hinckley, C.C: Paramagnetic Shifts in Solutions of Cholesterol and the Dipyridine Adduct of Trisdipivalomethanatoeuropium(III), A Shift Reagent. J. Am. Chem. Soc. 91, 1969, 5160-5162.
- [76] Evans, D.F.; Tucker, J.N. und Villardi, G.C.: Lanthanide Shift Reagents for Alkenes. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1975, 206-206.
- [77] Dambska, A. und Janowski, A.: Use of Silver Trifluoroacetate together with Lanthanide Shift Reagents for Simplification of  $^1\text{H}$  NMR Spectra of Aromatic Hydrocarbons. Org. Magn. Reson. 13(2), 1980, 122-125.

- 
- [78] Damska, A. und Janowski, A.: Use of Lanthanide Shift Reagents together with Silver Trifluoroacetate for Quantitative Analysis of Mixtures of Aromatic Hydrocarbons. *Chem. Anal.-Warsaw*. 25(1), 1980, 77-83.
- [79] Turczan, J.W. und Medwick, T.: Qualitative and quantitative Analysis of Amygdalin using NMR Spectroscopy. *Anal. Letters* 10, 1977, 581.
- [80] Cockerill, A.F.; Davis, G.L.O.; Harrison, R.G. und Rackham, D.M.: NMR determination of the enantiomer composition of penicillamine using an optically active europium shift reagent. *Org. Magn. Reson.* 6, 1974, 669.
- [81] Holzgrabe, U.; Diehl, B.W. und Wawer, I.: Review – NMR spectroscopy in pharmacy. *J. Pharmaceut. Biomed.* 17, 1998, 557-616.
- [82] Vailaya, A.; Wang, T.; Chen, Y. und Huffman, M.: Quantitative analysis of dimethyl titanocene by iodometric titration, gas chromatography and NMR. *J. Pharmaceut. Biom.* 25, 2001, 577-588.
- [83] Wells, R.J.; Hook, J.M.; Al-Deen, T.S. und Hibbert, D.B.: Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) Spectroscopy for Assessing the Purity of Technical Grade Agrochemicals: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Sodium 2,2-Dichloropropionate (Dalapon Sodium). *J. Agric. Food Chem.* 50, 2002, 3366-3374.
- [84] Henderson, T.J.: Quantitative NMR Spectroscopy Using Coaxial Inserts Containing a Reference Standards: Purity Determinations for Military Nerve Agents. *Anal. Chem.* 74, 2002, 191-198.
- [85] IUPAC: Atomic Weights of the Elements 1997. *Pure Appl. Chem.* 71(8), 1999, 1593-1607.
- [86] Pauli, G.F.: qNMR – A Versatile Concept for the Validation of Natural Product Reference Compounds. *Phytochem. Anal.* 12, (2001), 28-42.
- [87] Jancke, H.: NMR Spectroscopy as a Primary Analytical Method. Document 98/02 to the 4th Session of the CCQM, Sevres 1998.
- [88] Jaki, B.: Arbeitsanleitung zur Durchführung quantitativer NMR Messungen. ZA GmbH. Sinzig 2001
- [89] Peters, J. und Majer, H.: Garantiert NMR reproduzierbare Spektren. *Labor Praxis. Journal für Labor, Analytik und Life Science. Sonderdruck* 24(3), 2000.
- [90] Harvey, P.: NMR of  $\text{Sn}^n\text{Bu}_3\text{-Cl}$  and related compounds. NMR of Creatinine, Xylene(s), p,p'-DDE, o,p'-DDE and p,p'-DDT. NARL: Sydney 2000.
- [91] Harvey, P.: Draft Report CCQM-P20a. Sydney 2002.
- [92] Forshed, J.; Andersson, F.O. und Jacobsson, S.P.: NMR and Bayesian regularized neural network regression for impurity determination of 4-aminophenol. *J. Pharmaceut. Biomed.* 29, 2002, 495-505.
- [93] Meshitsuka, S.; Morio, Y.; Nagashima, H. und Teshima R.:  $^1\text{H}$ -NMR studies of cerebrospinal fluid: endogenous ethanol in patients with cervical myelopathy. *Clin. Chim. Acta* 312, 2001, 25-30.
- [94] Sahrbacher, U.; Pehlke-Rimpf, A.; Rohr, G.; Eggert-Kruse, W. und Kalbitzer, H.R.: High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of human cervical mucus. *J. Pharmaceut. Biomed.* 28, 2002, 827-840.
- [95] Xia, Z.; Akim, L.G. und Argyropoulos, D.S.: Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR Analysis of Lignins with Internal Standards. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2001, 3573-3578.

- 
- [96] Igarashi, T.; Aursand, M.; Hirata, Y.; Gribbestad, I.S.; Wada, S. und Nonaka, M.: Nondestructive Quantitative Determination of Docosahexaenoic Acid and n-3 Fatty Acids in Fish Oils by High-Resolution  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *JAOCS*. 77(7), 2000, 737-748.
- [97] Papke, N. und Karger-Kocsis, J.:  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR Analysis eines Nitrilkautschuks mit und ohne Glydimethacrylat Pfropfung. *Eur. Polym. J.* 37, 2001, 547-557.
- [98] Erickson, N.A.; Kolodny, N.H. und Allen, M.M.: A rapid and sensitive method for the analysis of cyanophycin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1526, 2001, 5-9.
- [99] Referenzmaterialien zur Atem-Alkoholbestimmung. Pressemitteilung Nr. 16/2002. Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM). Berlin 2002.
- [100] Liu, M.; Mao, X.; Ye, C.; Huang, H.; Nicholson, J.K. und Lindon, J.C.: Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 132, 1998, 125-129.
- [101] Zhang, S., Yang, X. und Gorenstein, D.G.: Suppression of linearly responsive residual water. *Concept. Magnetic Res.* 14(2), 2002, 102-111.
- [102] Jancke, H. und Webb, K.S.: CCQM Pilot Study – Determination of Ethanol (CCQM-P35) in Aqueous Matrix. Berlin u.a. 2001.
- [103] King, B. und Walker, R.: Quantifying the Reliability of Commercial Reference Materials. *Accredit. Qual. Assur.* 5, 2000, 151-153.
- [104] Jancke, H. und Malz, F.: Ringversuch BAM-NMR-3 – Gesamtergebnis. Berlin 2002.
- [105] Jancke, H. und Malz, F.: Bericht. Workshop zum Ringversuch BAM-NMR-3 18.6.2002 in Berlin-Adlershof. Berlin 2002.
- [106] Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM): Prüftechnik und chemische Analytik. Katalog der von der BAM bereitgestellten Referenzverfahren. Berlin 2001.



## 11 Anhang

### 11.1 Tabellen

Tabelle 11.1: Internationaler Ringversuch CCQM-P3. Auswertung als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf D<sub>4</sub>. Schätzwerte  $x_i$  und aus den Einzelwerten berechnete erweiterte Unsicherheiten  $U$  ( $k = 2,8$ ,  $p = 95\%$ ) der Teilnehmer.

	ETS		Par		Dur		Cy <sub>12</sub>	
	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$U$ in mol mol <sup>-1</sup>	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$U$ in mol mol <sup>-1</sup>	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$U$ in mol mol <sup>-1</sup>	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup>	$U$ in mol mol <sup>-1</sup>
BAM I	1,157	0,009	0,784	0,001	58,980	0,194	0,6810	0,0012
BAM II	1,161	0,011	0,786	0,002	59,046	0,296	0,6820	0,0012
EMPA	1,160	0,012	0,806	0,012	59,706	0,323	0,6890	0,0124
KRISS	1,080	0,037	0,830	0,075	59,090	0,448	0,7100	0,0249
NARL	1,133	0,009	0,779	0,004	58,750	0,224	0,6732	0,0030
NIMC	1,170	0,004	0,875	0,003	63,844	0,401	0,7278	0,0003
NMI	1,146	0,003	0,782	0,002	58,650	0,056	0,6831	0,0011
NRC	1,135	0,004	0,782	0,002	59,230	0,039	0,6765	0,0011
OMH	1,124	0,004	0,797	0,006	58,790	0,021	0,6900	0,0012
SMU	1,128	0,001	0,817	0,006	61,785	0,006	0,6970	0,0037
VNIIM	1,133	0,011	0,800	0,004	59,510	0,385	0,6968	0,0037

Tabelle 11.2: Internationaler Ringversuch CCQM-P3. Auswertung als Stoffmengenanteile. Schätzwerte  $x_i$  und aus den Einzelwerten berechnete erweiterte Unsicherheiten  $U$  ( $k = 2,8$ ,  $p = 95\%$ ) der Teilnehmer.

	ETS		Par		Dur		Cy <sub>12</sub>		D <sub>4</sub>	
	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ in mol mol <sup>-1</sup> %
BAM I	1,848	0,012	1,252	0,006	94,215	0,016	1,088	0,003	1,597	0,005
BAM II	1,853	0,018	1,254	0,009	94,210	0,031	1,087	0,007	1,596	0,008
EMPA	1,831	0,022	1,272	0,014	94,232	0,037	1,087	0,009	1,578	0,008
KRISS	1,720	0,058	1,323	0,122	94,231	0,169	1,131	0,033	1,595	0,009
NARL	1,817	0,013	1,249	0,004	94,249	0,022	1,080	0,005	1,604	0,006
NIMC	1,730	0,005	1,289	0,012	94,426	0,016	1,075	0,003	1,479	0,001
NMI	1,841	0,006	1,256	0,004	94,200	0,013	1,097	0,002	1,606	0,001
NRC	1,806	0,007	1,245	0,004	94,280	0,009	1,077	0,002	1,592	0,001
OMH	1,802	0,007	1,277	0,010	94,213	0,010	1,106	0,002	1,603	0,001
SMU	1,724	0,002	1,249	0,009	94,435	0,007	1,066	0,006	1,526	0,005
VNIIM	1,794	0,023	1,267	0,013	94,252	0,045	1,104	0,008	1,584	0,009

Tabelle 11.3: Nationaler Ringversuch NMR-2. Auswertung als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf D<sub>4</sub>. Schätzwerte  $x_i$  und aus den Einzelwerten berechnete erweiterte Unsicherheiten  $U$  ( $k = 2,8$ ,  $p = 95\%$ ) der Teilnehmer.

	ETS		Par		Dur		Cy <sub>12</sub>	
	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ %	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ %	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ %	$x_i$ in mol mol <sup>-1</sup> %	$U$ %
1	2,691	0,072	1,881	0,016	257,5	2,6	2,116	0,025
2	2,660	0,025	1,890	0,012	264,8	4,8	2,120	0,012
3	2,607	0,119	1,892	0,046	264,0	6,5	2,131	0,041
4	2,589	0,143	2,062	0,149	260,4	3,8	2,054	0,031
5	2,586	0,062	1,838	0,037	261,3	3,2	2,150	0,025
6	2,586	0,050	1,862	0,012	255,1	0,9	2,119	0,000
7	2,616	0,027	1,894	0,032	254,3	0,5	2,128	0,014
8	2,672	0,037	1,907	0,012	264,1	1,0	2,139	0,012
9	2,624	0,050	1,873	0,037	261,2	4,4	2,119	0,037
10	2,796	0,660	1,792	0,104	249,8	12,9	2,012	0,096
11	2,640	0,037	1,910	0,012	283,6	2,1	2,190	0,012
12	2,693	0,029	1,862	0,006	255,3	1,0	2,079	0,009
13	2,675	0,035	1,866	0,029	254,1	0,6	2,106	0,011
14	2,706	0,045	1,873	0,009	257,0	2,3	2,081	0,009
15	2,584	0,011	1,854	0,014	255,2	1,6	2,076	0,014
16	2,621	0,024	1,867	0,024	257,5	0,5	2,085	0,006
17	2,739	0,010	1,867	0,014	257,3	1,7	2,111	0,020
18	2,625	0,034	1,857	0,012	257,4	3,5	2,097	0,019
19	2,618	0,022	1,868	0,014	259,7	1,1	2,103	0,019
20	2,760	0,042	1,939	0,026	254,3	1,4	2,095	0,006
21	2,680	0,083	1,856	0,030	252,1	2,3	2,082	0,025
22	2,619	0,015	1,864	0,012	256,3	0,3	2,096	0,002
23	2,613	0,050	1,861	0,012	255,2	1,2	2,075	0,012
24	2,520	0,032	1,890	0,034	262,6	0,7	2,120	0,006
25	2,700	0,046	1,878	0,040	262,5	2,2	2,131	0,017
26	2,672	0,019	1,916	0,034	254,0	0,5	2,075	0,028
27	2,680	0,051	1,877	0,024	259,8	4,1	2,124	0,019
28	2,631	0,041	1,892	0,016	259,0	0,7	2,245	0,017
29	2,628	0,017	1,856	0,005	259,9	0,8	2,086	0,008
30	2,600	0,020	1,860	0,006	257,5	0,7	2,090	0,011
31	2,670	0,037	1,850	0,037	255,6	1,0	2,110	0,025
32	2,859	0,064	1,864	0,020	261,9	4,7	2,100	0,040
33	2,656	0,040	1,866	0,015	255,1	1,2	2,094	0,012
34	2,914	0,052	2,344	0,041	323,2	4,8	2,532	0,036
35	3,210	0,395	1,876	0,469	397,6	51,7	2,303	0,264
36	2,486	0,162	1,822	0,261	236,8	14,8	2,040	0,075
37	2,621	0,124	1,866	0,025	257,8	5,2	2,091	0,037
38	2,618	0,128	1,805	0,046	258,0	10,0	2,071	0,061

Tabelle 11.4: Nationaler Ringversuch NMR-2. Auswertung als Stoffmengenanteile. Schätzwerte  $x_i$  und aus den Einzelwerten berechnete erweiterte Unsicherheiten  $U$  ( $k = 2,8$ ,  $p = 95\%$ ) der Teilnehmer.

	ETS		Par		Dur		Cy <sub>12</sub>		D <sub>4</sub>	
	$x_i$	$U$	$x_i$	$U$	$x_i$	$U$	$x_i$	$U$	$x_i$	$U$
	in mol mol <sup>-1</sup> %		in mol mol <sup>-1</sup> %		in mol mol <sup>-1</sup> %		in mol mol <sup>-1</sup> %		in mol mol <sup>-1</sup> %	
1	1,015	0,026	0,709	0,005	97,100	0,031	0,798	0,005	0,377	0,004
2	0,978	0,027	0,693	0,009	97,183	0,050	0,779	0,009	0,367	0,006
3	0,960	0,067	0,697	0,022	97,190	0,106	0,785	0,019	0,368	0,009
4	0,965	0,043	0,769	0,056	97,126	0,051	0,766	0,009	0,373	0,006
5	0,963	0,020	0,684	0,013	97,182	0,042	0,800	0,018	0,372	0,004
6	0,984	0,017	0,709	0,007	97,122	0,018	0,807	0,003	0,378	0,001
7	0,997	0,013	0,722	0,010	97,087	0,009	0,815	0,004	0,379	0,001
8	0,983	0,014	0,702	0,001	97,160	0,017	0,787	0,003	0,368	0,001
9	0,980	0,013	0,697	0,004	97,163	0,018	0,788	0,003	0,372	0,006
10	1,088	0,257	0,696	0,009	97,045	0,252	0,782	0,006	0,389	0,020
11	0,906	0,011	0,657	0,005	97,344	0,016	0,751	0,002	0,343	0,002
12	1,024	0,011	0,708	0,005	97,097	0,018	0,790	0,004	0,380	0,001
13	1,020	0,014	0,713	0,010	97,080	0,016	0,805	0,005	0,382	0,001
14	1,022	0,017	0,708	0,005	97,106	0,024	0,786	0,005	0,378	0,003
15	0,983	0,005	0,706	0,007	97,140	0,013	0,790	0,004	0,381	0,002
16	0,989	0,008	0,704	0,008	97,143	0,015	0,786	0,001	0,377	0,001
17	1,034	0,009	0,704	0,004	97,088	0,017	0,797	0,008	0,377	0,002
18	0,991	0,006	0,701	0,006	97,139	0,017	0,791	0,004	0,377	0,005
19	0,980	0,006	0,697	0,005	97,162	0,012	0,787	0,007	0,374	0,002
20	1,053	0,021	0,740	0,007	97,027	0,024	0,799	0,003	0,382	0,002
21	1,031	0,024	0,715	0,014	97,068	0,025	0,801	0,004	0,385	0,004
22	0,993	0,005	0,706	0,005	97,128	0,009	0,794	0,001	0,379	0,000
23	0,995	0,017	0,708	0,008	97,125	0,029	0,791	0,007	0,380	0,002
24	0,934	0,011	0,698	0,011	97,214	0,013	0,784	0,002	0,370	0,001
25	0,999	0,020	0,695	0,010	97,147	0,013	0,789	0,005	0,370	0,003
26	1,021	0,008	0,732	0,013	97,071	0,014	0,793	0,009	0,382	0,001
27	1,002	0,016	0,702	0,008	97,128	0,030	0,794	0,011	0,374	0,006
28	0,986	0,017	0,709	0,006	97,087	0,024	0,842	0,008	0,375	0,001
29	0,983	0,008	0,694	0,001	97,170	0,010	0,780	0,003	0,374	0,001
30	0,983	0,011	0,702	0,002	97,149	0,008	0,789	0,003	0,377	0,001
31	1,013	0,010	0,705	0,012	97,101	0,024	0,801	0,005	0,381	0,001
32	1,060	0,017	0,691	0,010	97,099	0,025	0,779	0,012	0,371	0,007
33	1,011	0,016	0,712	0,009	97,099	0,017	0,797	0,001	0,381	0,002
34	0,878	0,026	0,706	0,007	97,352	0,032	0,763	0,004	0,301	0,004
35	0,792	0,103	0,457	0,064	97,935	0,136	0,569	0,088	0,247	0,031
36	1,021	0,111	0,750	0,143	96,982	0,319	0,837	0,073	0,410	0,026
37	0,988	0,036	0,705	0,023	97,142	0,023	0,788	0,009	0,377	0,008
38	0,988	0,066	0,681	0,023	97,171	0,107	0,782	0,030	0,378	0,014

Tabelle 11.5: Nationaler Ringversuch NMR-2. Auswertung der zugesandten FIDs als Stoffmengenverhältnisse bezogen auf  $\text{C}_{12}$ . Gegenüberstellung der eigenen Messwerte gegen die der Teilnehmer: Schätzwerte  $x_i$  und aus den Einzelwerten berechnete erweiterte Unsicherheiten  $U$  ( $k = 2,8$ ,  $p = 95\%$ ). Institute 23 und 32 sandten jeweils nur ein FID zu, so dass keine Unsicherheit berechnet werden konnte (--).

		ETS		Par		Dur		D <sub>4</sub>	
		$x_i$	$U$	$x_i$	$U$	$x_i$	$U$	$x_i$	$U$
		in mol mol <sup>-1</sup>		in mol mol <sup>-1</sup>		in mol mol <sup>-1</sup>		in mol mol <sup>-1</sup>	
1	Teilnehmer	1,271	0,022	0,889	0,005	121,6	0,6	0,472	0,004
	Eigen	1,284	0,015	0,891	0,003	123,0	0,3	0,474	0,002
2	Teilnehmer	1,255	0,018	0,890	0,007	124,8	1,3	0,471	0,003
	Eigen	1,318	0,026	0,809	0,003	124,3	0,5	0,473	0,002
3	Teilnehmer	1,223	0,058	0,888	0,019	123,9	2,6	0,469	0,008
	Eigen	1,290	0,024	0,910	0,009	123,3	0,4	0,462	0,002
10	Teilnehmer	1,392	0,283	0,890	0,013	125,6	3,5	0,497	0,020
	Eigen	1,247	0,025	0,895	0,008	124,1	2,6	0,483	0,010
11	Teilnehmer	1,207	0,013	0,875	0,006	129,7	0,4	0,457	0,002
	Eigen	1,262	0,010	0,899	0,019	124,1	0,7	0,464	0,002
15	Teilnehmer	1,244	0,008	0,893	0,004	122,9	0,5	0,482	0,003
	Eigen	1,282	0,010	0,889	0,003	122,03	0,11	0,480	0,001
16	Teilnehmer	1,257	0,007	0,896	0,008	123,52	0,17	0,480	0,001
	Eigen	1,291	0,014	0,892	0,004	122,7	0,7	0,480	0,001
18	Teilnehmer	1,252	0,008	0,886	0,004	122,7	0,5	0,477	0,004
	Eigen	1,274	0,004	0,889	0,004	122,9	0,4	0,479	0,002
21	Teilnehmer	1,287	0,026	0,892	0,013	121,1	0,6	0,480	0,005
	Eigen	1,289	0,007	0,891	0,004	121,7	0,5	0,478	0,002
22	Teilnehmer	1,250	0,006	0,889	0,006	122,28	0,09	0,477	0,001
	Eigen	1,293	0,007	0,888	0,004	122,1	0,2	0,480	0,001
23	Teilnehmer	1,257	0,016	0,895	0,004	122,7	0,9	0,481	0,004
	Eigen	1,290	--	0,894	--	121,6	--	0,478	--
25	Teilnehmer	1,268	0,026	0,882	0,012	123,2	0,7	0,469	0,003
	Eigen	1,306	0,014	0,892	0,011	124,2	0,9	0,477	0,001
28	Teilnehmer	1,172	0,009	0,843	0,011	115,4	1,0	0,446	0,003
	Eigen	1,295	0,013	0,896	0,004	122,3	0,3	0,484	0,002
30	Teilnehmer	1,246	0,014	0,890	0,004	123,2	0,4	0,478	0,002
	Eigen	1,271	0,017	0,898	0,005	123,7	0,4	0,479	0,002
31	Teilnehmer	1,266	0,007	0,880	0,010	121,3	0,7	0,475	0,003
	Eigen	1,290	0,010	0,894	0,004	122,0	0,4	0,481	0,001
32	Teilnehmer	1,361	0,032	0,887	0,008	124,7	1,7	0,476	0,008
	Eigen	1,282	--	0,892	--	122,5	--	0,478	--

Tabelle 11.6: Internationaler Ringversuch CCQM-P35. Ethanol-Gehalte einer forensischen Probe und eines kommerziellen Weißweins. Eingesandte Schätzwerte  $x_i$  und deren erweiterte Unsicherheiten  $U$  ( $p = 95 \%$ ). „--“: kein Ergebnis abgeliefert.

	Forensische Probe		Weißwein	
	$x_i$	$U$	$x_i$	$U$
	in mg g <sup>-1</sup>		in mg g <sup>-1</sup>	
1 (GC)	1,083	0,011	101,5	2,7
1 (Titration)	1,079	0,003	--	--
2 (GC)	1,081	0,007	103,4	0,8
2 (NMR)	1,053	0,011	96,2	1,1
3 (NMR)	1,079	0,012	101,9	0,4
4 (NMR)	1,071	0,007	100,2	0,8
5 (GC)	1,077	0,002	99,5	0,4
5 (NMR)	1,17	0,04	113,6	3,8
8 (GC)	1,075	0,003	99,8	0,4
8 (NMR)	1,074	0,015	--	--
9 (GC)	1,086	0,019	99,5	1,0
9 (NMR)	1,085	0,008	101,8	0,8
10 (GC)	1,150	0,005	105,9	0,6
10 (NMR)	1,133	0,007	109,9	1,7
11 (GC)	1,073	0,028	101,4	3,3
12 (NMR)	1,114	0,014	101,1	0,8

Tabelle 11.7: Teilnehmer am nationalen Ringversuch NMR-2.

D. Scheller (TU Dresden); R. Lehnert (Hüls StructurA GmbH Nünchritz); M. Findeisen (Universität Leipzig); A. Porzel (IPB Halle); K. Schlothauer (FH Merseburg); C. Mügge (Humboldt-Universität zu Berlin); J. Pauli (FMP Berlin); D. Müller (ACA); F. Malz (BAM); H. Jancke (BAM); G. Michl (Schering AG Berlin); M. Heydenreich (Universität Potsdam); H.-H. Otto (Universität Greifswald); W. Baumann (Universität Rostock); E. Haupt (Universität Hamburg); A. Preiß (FhG-ITA Hannover); H.-H. Lischke (Honeywell Speciality Seelze); S. Th. Augner (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf); W. Etzel (Bayer AG Mohnheim); J. Lambert (ISAS Dortmund); R. Gerhards (Goldschmidt-AG Essen); N. Metzler-Nolte (MPI für Strahlenchemie Mülheim/Ruhr); H.-J. Metternich (Infracor GmbH Marl); J. Meyer (Infraserv GmbH & Co. Knapsack KG Hürth); R. Unger (Spectral Service GmbH Köln); M. Kaiser (WIWEB Swistal); J. Hauß (Merck KGaA Darmstadt); G. Krack (BASF AG Ludwigshafen); A. Hermann (Chemisches Untersuchungsamt Speyer); M. Engelhardt (Bruker Analytik GmbH Rheinstetten); R. P. Hummel (Byk-Gulden GmbH Konstanz); H. Ritter (Deutsch-Französisches Forschungsinstitut Saint-Louis I.S.L.); A. Zahl (Universität Erlangen); H.-U. Humpf (Universität Würzburg).

## 11.2 Geräte und Chemikalien

### BAM

NMR-Spektrometer:	Bruker Avance DMX 400
Messfrequenzen:	400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ), 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ )
Messköpfe:	5mm QNP, 5mm TXI, 10mm HR, 10mm $^{29}\text{Si}$ -Spezial

### Humboldt-Universität

NMR-Spektrometer (1):	Bruker Avance DPX 300
Messfrequenz (1):	300,13 MHz ( $^1\text{H}$ )
Messkopf (1):	5mm QNP
NMR-Spektrometer (2):	Bruker Avance AMX 600
Messfrequenz (2):	600,13 MHz ( $^1\text{H}$ )
Messkopf (2):	5mm BBI

### Bruker BioSpin GmbH

NMR-Spektrometer (1):	Bruker Avance 500
Messfrequenz (1):	500,12 MHz ( $^1\text{H}$ )
Messköpfe (1):	5mm TXI , 5mm Kryo-TXI
NMR-Spektrometer (2):	Bruker Avance 600
Messfrequenz (2):	600,13 MHz ( $^1\text{H}$ )
Messkopf (2):	5mm TXI
NMR-Spektrometer (3):	Bruker Avance 800
Messfrequenzen (3):	800,25 MHz ( $^1\text{H}$ ), 201,22 MHz ( $^{13}\text{C}$ )
Messkopf (3):	5mm TXI

**Interne Standards (Reinheitsgrad)**

Benzoessäure SRM 350a ( zertifizierte Reinheit von  $(99,9958 \pm 0,0027)$  g/g %) NIST, 1,2,4,5-Tetramethylbenzol (> 99 %) Fa. Merck, Maleinsäure (> 99 %) Fa. Merck, 3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionsäure-Natriumsalz (> 99 %) Fa. Merck

**Substanzen (Reinheitsgrad)**

Cyclododecan (> 99 %) Fa. Merck, Ethanol (> 99,8 %) Fa. Merck, Ethylbenzol (> 99 %) Fa. Merck, Ethyl-p-toluolsulfonat (> 99 %) Fa. Merck, Ethylbenzoat (> 98 %) Fa. Merck, Oktamethylcyclotetrasiloxan (> 98 %) Fa. Acros, [2,2]-Paracyclophan (> 99 %) Fa. Acros, Phthalsäurediethylester (> 99 %) Fa. Merck, Silbertrifluoracetat (> 98 %) Fa. Merck, Tris-[1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-7,7-dimethyl-4,6-oktandionat]-Europium (keine Angabe) Fa. Norell Chemical Co., m-Xylol (> 99 %) Fa. Merck, o-Xylol (> 99 %) Fa. Merck, p-Xylol (> 99 %) Fa. Merck

**Deuterierte Lösungsmittel (Deuterierungsgrad)**

Benzol-d<sub>6</sub> (> 99,5 %) Fa. Merck, (> 99,5 %) Akademie der Wissenschaften, Chloroform-d<sub>1</sub> (> 99,6 %) Fa. Acros, (> 99,8 %) Fa. Merck, Deuteriumoxid-d<sub>2</sub> (> 99,5 %) VEB Berlin Chemie, Dimethylsulfoxid-d<sub>6</sub> (> 99,6 %) Fa. Chemotrade, Methanol-d<sub>4</sub> (> 99,96 %) Fa. Euriso-top, Tetrachlorkohlenstoff (entfällt) VEB Berlin Chemie

### 11.3 Presaturation-Pulsprogramme

Original Bruker-Pulsprogramm "zgpr":

```

1    ze
2    d12 pl9:f1
      d1 cw :f1
      d13 do :f1
      d12 pl1:f1
      p1 ph1
      go=2 ph31
      wr #0

exit

ph1 = 0 2 2 0 1 3 3 1
ph31= 0 2 2 0 1 3 3 1

```

Modifizierte cw-Presaturation „zgpr.fm“:

```

1    ze
2    d1
      d12 pl9:f1
      d20 cw :f1
      d13 do :f1
      d12 pl1:f1
      p1 ph1
      go=2 ph31
      wr #0

exit

ph1 = 0 2 2 0 1 3 3 1
ph31= 0 2 2 0 1 3 3 1

```

Modifizierte pg-Presaturation „zgpr.jp“:

```

1    ze
2    d1
      d12 pl9:f1
      p9 ph9
      d12 pl1:f1
      p1 ph1
      go=2 ph31
      wr #0

exit

ph1 = 0 2 2 0 1 3 3 1
ph9 = 1 3 3 1 2 0 0 2
ph31= 0 2 2 0 1 3 3 1

```



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung im Labor I.31 „Magnetische Resonanzspektroskopie“ angefertigt. Für die Möglichkeit der Durchführung und die Bereitstellung der Arbeitsmittel möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. A. Zschunke gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Reich und Herrn Prof. Dr. M. Linscheid danke ich für die Übernahme der Koreferate.

Bei Herrn Dr. H. Jancke möchte ich mich besonders für die intensive Betreuung im Labor und für die Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Ferner danke ich allen Mitarbeitern/in des Labors I.31 für ihre stete Hilfsbereitschaft und das kollegiale Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. R. Radeaglia und dem Fond der chemischen Industrie für die zur Verfügung gestellten Lehrbücher sowie für die interessanten Gespräche, in denen er mir auf einfache Weise komplizierte Grundlagen verständlich machte, und ebenso Herrn Dipl.-Ing. (Fh) W. Altenburg für die stets hervorragend eingestimmten Messköpfe, die zur optimalen Auflösungen der Spektren wesentlich beigetragen haben.

Den Herren Dr. W. Hässelbarth und Dr. W. Bremser (beide I.01) danke ich für die Unterstützung bei der Unsicherheitsbetrachtung und beim Aufstellen der Unsicherheitsbudgets.

Bei Frau Prof. Dr. I. Nehls und den Mitarbeitern der Fachgruppe I.2 möchte ich mich bedanken für die Herstellung von forensischen Ethanol-Referenzlösungen sowie für die Hilfestellungen bei allen Fragen bezüglich der Ethanol-in-Wasser-Problematik. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. R. Philipp und den Herren Dr. T. Win und Dr. M. Koch, alle drei von der Laborgruppe I.22.

Den Herren Dr. C. Mügge und Dipl.-Ing. W.-D. Bloedorn (beide HUB) danke ich für die Möglichkeit, an den NMR-Spektrometern der HUB Vergleichsmessungen durchzuführen, und die mir dabei zugekommene Unterstützung.

Den Herren Dr. M. Engelhard, Dr. S. Cunsakis und Dr. R. Kerssebaum von der Firma Bruker BioSpin GmbH danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Klärung NMR-spezifischer Fragen. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn D. R. Kerssebaum dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, an modernsten NMR-Geräten zu messen.

Für die rege und gewissenhafte Beteiligung an den nationalen und internationalen Ringversuche danke ich allen Teilnehmern.

Meiner Schwägerin Frau S. Telschow-Malz gilt mein Dank für das sorgfältige Korrekturlesen.

Meiner Frau Beatrix möchte ich für ihr Verständnis meiner Arbeit gegenüber herzlich danken

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Frank Malz

Geboren am: 09.11.1969 in Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet mit Beatrix Malz, geborene Sojka

### Schulausbildung:

1976-1982 Erpelgrund-Grundschule in Berlin-Heiligensee

1982-1989 Humboldt-Gymnasium in Berlin-Tegel

05/1989 Abitur

### Studium:

1989-1999 Chemiestudium an der Technischen Universität Berlin

11/1998-05/1999 Diplomarbeit an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) im Labor I.31: „Validierung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie als primäre analytische Methode“

09/1999-10/2002 Promotion an der BAM im Labor I.31

### Berufstätigkeit:

02/1990-08/1991 Während der vorlesungsfreien Zeiten (Februar bis März, Juli bis August) Mitarbeiter im chemischen Labor bei Nordgetränke GmbH & Co. KG (laufende Qualitätskontrolle)

01/1997-07/1998 Werkstudent bei Siemens-KWU im Meisterbüro (EDV-Tätigkeiten)

Seit 09/1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der BAM

**Weiterbildung:**

11/1998	QS-Seminar (Sartorius) „Einsatz von Waagen als Prüfmittel in Qualitäts-Management-Systemen“
09/1999	DAR - Konformitätsbewertung, Akkreditierung und Begutachtungstechniken
04/2000-09/2000	Grundkurs „Qualitätsmanagement in der Analytischen Chemie“ an der Humboldt-Universität
10/2000	Trainingskurs „Avance Operator“ bei Bruker BioSpin GmbH
Seit 09/1999	Teilnahme am BAM-Zirkel „Ergebnisunsicherheit“

## **Selbstständigkeitserklärung**

Diese Arbeit wurde von Frank Malz im Zeitraum von September 1999 bis Dezember 2002 an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung selbstständig angefertigt. Es wurden keine anderen als die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Berlin, den 07.01.2003